

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE L'AUTOPHAGIE ET LA MITOPHAGIE DANS L'OPTIMISATION
DES FONCTIONS MITOCHONDRIALE DANS LE MUSCLE DYSTROPHIQUE.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN KINANTHROPOLOGIE

PAR

NICOLAS SGARIOTO

NOVEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Dans la vie il y a ce qu'on doit faire, ce que l'on veut faire et puis ce qu'on peut faire.

Et parfois tout se combine bien.

Je tiens à remercier tout d'abord, mes directeurs, le Dr Mylène Aubertin-Leheudre et le Dr Yan Burelle pour leur patience à m'écouter, infini témoignage de leur courage et de leur abnégation. Leur générosité, de m'avoir pris sous leurs ailes au soleil comme par temps gris, et puis tout le reste qui ne se dit pas et qui se vit.

Mon fabuleux jury, les Drs Gouspillou et Gentil qui ont su distiller en moi, la rigueur et le sérieux nécessaire à l'accomplissement de ce travail.

Mes collègues de l'UdeM dont les noms résonneront pour l'éternité dans une gamme de rires et de larmes, aussi variable que l'humeur vagabonde d'un étudiant en maîtrise. À vous, Sonia Deschênes, François Brisebois, Alexanne Cuillierier, Virgilio de Jesus Cadete et les virevoltants papillons. Merci.

Mes amis si proches et que rien n'arrête, même pas une discussion à propos des mitochondries, du système autophagique ou de Babar le Homard. À vous Eric Garat, Charlotte Pion, Guillaume L'Etoile, Pauline et tous les autres. Merci.

Un immense merci à Brandy, pour avoir été mon fournisseur officiel de publications introuvables, vieille de 400 ans, oubliées, brûlées ... Oh Brandy, you Rock !

Ma petite famille si loin, qui ne manque jamais d'encouragement, de soutien et de compréhension à mon égard et qui j'en suis sûr, est fière. Maman, Papa, Amandine, merci beaucoup !

Enfin à toi, mon petit Minouchat, du début à la fin tu m'as soutenu, parfois même porté. Tu as cru en moi quand moi je n'y croyais pas tant, et j'espère un jour pouvoir t'accompagner de même dans une de tes aventures.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE	1
1.1 description de la maladie.....	1
1.2 Traitements et avancées dans le domaine	4
CHAPITRE II	
BIOLOGIE MITOCHONDRIALE ET SON RÔLE DANS LA PATHOGENÈSE DE LA DMD	15
2.1 Les fonctions mitochondriales en situation physiologique	15
2.1.1 Production d'énergie.....	16
2.1.2 Homéostasie calcique	19
2.1.3 Stress oxydant.....	19
2.1.4 Mort cellulaire	20
2.2 Rôle de la mitochondrie dans la pathogenèse de la DMD	21
2.2.1 Les dysfonctions énergétiques et métaboliques.....	21
2.2.2 Le stress oxydant dans la pathologie de la DMD	22
2.2.3 L'homéostasie calcique et les messagers pro-apoptotiques dans la DMD	24
CHAPITRE III	
AUTOPHAGIE, MITOPHAGIE ET RÔLE DE CES PROCESSUS DANS LA PATHOLOGIE DE LA DMD	31
3.1 Autophagie : mécanismes et voies moléculaires.....	31
3.1.1 Formation et maturation de l'auto-phagophore : du PAS au lysosome	34

3.1.2 Répresseurs endogènes de l'autophagie	41
3.1.3 Influence du calcium sur l'auto-phagosome	44
3.2 Autophagie et pathologies musculaire	47
3.2.1 Conséquences pathologiques d'un déficit d'autophagie.....	49
3.2.2 Conséquences pathologiques d'un excès d'autophagie.....	56
3.3 La mitophagie.....	59
CHAPITRE IV	
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	65
CHAPITRE V	
MÉTHODES DE DÉTECTION, MESURES ET ANALYSES	68
5.1 Croisements des souris, gestion de colonies et genotypage	68
5.1.1 Obtention des souris	68
5.1.2 Maintien de la colonie	71
5.1.3 Gestion du génotype	71
5.2 Respiration, production de radicaux libres et capacité de rétention calcique sur fibres perméabilisées.....	72
5.2.1 La perméabilisation de fibres, principes et intérêts	72
5.2.2 Respiration mitochondriale.....	74
5.2.3 Production de radicaux libres	77
5.2.4 Rétention calcique et ouverture du pore de perméabilité	78
5.3 Activités des complexes de la chaîne respiratoire.....	81
5.4 Évaluation du contenu mitochondrial via des marqueurs protéiques.....	85
5.4.1 Préparation des échantillons	85
5.4.2 Détection des protéines d'intérêts.....	86
5.5 Flux autophagique et mitophagie	87
5.5.1 Drogue et protocole animal	88
5.5.2 Détection et résultats.....	89
5.6 Statistiques	89
CHAPITRE VI	
RÉSULTATS	90
6.1 Caractérisation phénotypique des souris <i>mdx-Park2^{-/-}</i>	90

6.2	Impact de la perte d'expression de PARKIN sur l'autophagie et la mitophagie chez la souris <i>mdx</i>	94
6.3	Impact de la perte d'expression de PARKIN sur les fonctions mitochondriales de la souris <i>mdx</i>	100
6.4	Caractérisation phénotypique des souris <i>mdx-Naf-1</i> ^{+/-}	113
6.5	Impact de la perte d'expression partielle de NAF-1 sur l'autophagie et la mitophagie chez la souris <i>mdx</i>	116
6.6	Impact de la perte d'expression partielle de NF-1 sur le contenu et les fonctions mitochondriales de la souris <i>mdx</i>	119
CHAPITRE VII		
DISCUSSION		130
CONCLUSION		144
BIBLIOGRAPHIE		147

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Localisation cellulaire de la dystrophine. Tiré de Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. Am J Phys Med Rehabil. Petrof B.J. 2002	2
1.2 Représentations photographiques (A) et esquisses (B) de Joseph Sarrazin, premier cas identifié par Duchenne, issues de «Duchenne G.B.A, Album de photographes pathologiques. Paris : Baillière ; 1862 ». Représentation photographique du syndrome de Gowers (C), montrant l'incapacité de l'enfant à se lever à l'aide de ses jambes uniquement, issues de « Dejerine J, Trouble de la motilité. Sémiologie des affections du système nerveux. Paris : Masson; 1914 »	3
1.3 Parallèle entre l'étiologie de la DMD chez l'Homme et le modèle de souris mdx.....	6
1.4 Modifications des paramètres fonctionnels du réticulum sarcoplasmique dans un contexte myopathique. Tiré de Biochemical Abnormalities of the Sarcoplasmic Reticulum in Muscular Dystrophy. The new England journal of medicine.Samaha Frederick J. 1969.....	11
2.1 Représentation schématique de la chaîne respiratoire. Inspiré de Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. Physiology. O'Rourke B. 2005.....	18
2.2 Schématisation des voies stimulées par les dommages musculaires induits par les contraintes mécaniques. Tiré de Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. Journal of physiology. Allen D.G .2005	26
3.1 Représentation schématique des phases de l'autophagie. Inspiré de Definition, Molecular Machinery, and Potential Role in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics.2010. Dong Yi.....	33
3.2 Formation de l'autophagosome à proximité du réticulum endoplasmique. Tiré de Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and	

	dynamically connected to the endoplasmic reticulum. The Journal of Cell Biology. Axe, Elizabeth L. 2008.....	35
3.3	Interactions entre réticulum endoplasmique, mitochondrie et autophagosome. Tiré de Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. Hailey, Dale W. 2010.....	36
3.4	Schéma de fermeture du phagophore. Tiré de The late stages of autophagy : how does it begin. Cell death and differentiation. T, Noda . 2009.....	39
3.5	Les inhibiteurs de l'autophagie. Tiré de Negative regulation of autophagy. Cell Death & Differentiation, 2010. Liang, C.....	43
3.6	Visualisation des pathologies liées aux variations de l'autophagie. Tiré de Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. Cell Biology and Disease. Sandri. M. 2013	48
3.7	Observation de l'altération de l'autophagie chez les souris mdx et chez des patients DMD. Tiré de Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. Cell Death and Disease. De Palma C. 2012.....	54
3.8	Évidence de l'augmentation de l'autophagie dans un modèle murin de l'ablation de NAF-1. Tiré de Bcl-2-associated autophagy regulator Naf-1 required for maintenance of skeletal muscle. Human molecular genetics. Chang N.C. 2012	58
3.9	Différents types de mitophagie chez les mammifères. Tiré de [278]	60
3.10	Mécanisme de sélection des mitochondries pour dégradation par le système autophagique. Tiré de [284].....	61
3.11	Modèle de recrutement et d'activation de PARKIN à la membrane mitochondriale. Tiré de [294]	63
5.1	Schéma des croisements génétiques opérés pour obtenir les souris <i>mdx</i> -Parkin	70
5.2	Schéma de la préparation des fibres.....	74
5.3	Courbe d'oxygraphie type.....	76
5.4	Courbe type de production de radicaux libres	78

5.6	Courbe type de la mesure de rétention calcique et de l'ouverture du pore....	80
6.1	Effet de l'ablation de PARKIN sur la masse des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	93
6.2	Effet de l'ablation de PARKIN sur le ratio LC3 II/I chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	96
6.3	Effet de l'ablation de PARKIN sur la mitophagie chez la souris <i>mdx</i> à 6 semaines	100
6.4	Effet de l'ablation de PARKIN sur la respiration mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	103
6.5	Effet de l'ablation de PARKIN sur la relâche nette d'H ₂ O ₂ mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	106
6.6	Effet de l'ablation de PARKIN sur la CRC et le TOP mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	109
6.7	Effet de l'ablation de PARKIN sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	112
6.8	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la masse des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	115
6.9	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	118
6.10	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la respiration mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	122
6.11	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la relâche nette d'H ₂ O ₂ mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	125
6.12	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	128
7.1	Effet de l'ablation de PARKIN sur la fonction mitochondriale	133
7.2	Effet de l'ablation de PARKIN sur le flux autophagique (données non publiés)	135
7.3	Effet de l'ablation de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I et le flux autophagique chez la souris [228]	138

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Tableau de l'origine des protéines des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase.....	16
2.2 Comparaison des méthodes de mesures du calcium intracellulaire chez les souris mdx ou des patients atteints de DMD ainsi que les résultats obtenus. Tiré de Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. Gillis Jean-Marie.1996.....	25
3.1 Littérature divergente sur la question de la régulation de l'autophagie par le calcium. Tiré de A dual role for Ca ²⁺ in autophagy regulation. Cell Calcium. Decuypere Jean-Paul.2011.	44
5.1 Composition du tampon de mesure du complexe I.....	82
5.2 Composition du tampon de mesure du complexe II	83
5.3 Composition du tampon de mesure du complexe IV	84
5.4 Composition du tampon de mesure de la citrate synthase	85
6.1 Effet de l'ablation de PARKIN sur la masse des souris mdx à 6 et 12 semaines.....	92
6.2 Effet de l'ablation de PARKIN sur le ratio LC3 II/I chez la souris mdx à 6 et 12 semaines	95
6.3 Effet de l'ablation de PARKIN sur la mitophagie chez la souris mdx à 6 semaines.....	98
6.4 Effet de l'ablation de PARKIN sur la respiration mitochondriale des souris mdx à 6 et 12 semaines	102
6.5 Effet de l'ablation de PARKIN sur la relâche nette d'H ₂ O ₂ mitochondriale des souris mdx à 6 et 12 semaines	105
6.6 Effet de l'ablation de PARKIN sur la CRC et le TOP mitochondriale des souris mdx à 6 et 12 semaines	108

6.7	Effet de l'ablation de PARKIN sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	111
6.8	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la masse des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines.....	114
6.9	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines.....	117
6.10	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la respiration mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines.....	121
6.11	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la relâche nette d'H ₂ O ₂ mitochondriale des souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	124
6.12	Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris <i>mdx</i> à 6 et 12 semaines	127

RÉSUMÉ

Au cours de ces dernières années, le laboratoire du Dr Burelle s'est intéressé au rôle des dysfonctions mitochondriales dans la pathogenèse de la DMD [1-4]. Les déficits énergétiques mitochondriaux observés dans le modèle murin de la DMD (souris *mdx*) [5-7], les taux élevés de stress oxydatif [8, 9] et les perturbations de l'homéostasie calcique [10-13] ont permis de déterminer l'importance des dysfonctions mitochondriales dans cette pathologie mais également de mettre en valeur l'intérêt des interventions thérapeutiques visant à optimiser les fonctions mitochondriales.

Par ailleurs, il est de plus en plus reconnu que l'équilibre entre la dégradation et la biogenèse des mitochondries est un aspect à prendre en considération dans l'étude de la fonctionnalité de ces organelles. L'autophagie est un mécanisme cellulaire majeur dans le processus d'élimination des protéines endommagées et des organelles dysfonctionnelles telles que les mitochondries. Or des études récentes montrent que l'autophagie est insuffisante dans le muscle dystrophique [3, 14, 15] et que la stimulation de ce processus permet une amélioration des fonctions mitochondriales et du phénotype musculaire en général. Le processus de dégradation spécifique des mitochondries, la mitophagie [16], et son rôle dans le muscle strié squelettique sont quant à eux encore peu décrits.

Dans le cadre de ce mémoire de maîtrise, nous avons donc réalisé un croisement génétique de la souris dystrophique *mdx* avec deux modèles murins dans lesquels le processus autophagique est perturbé. Le premier modèle présente une inactivation partielle de l'expression du gène codant pour la protéine NAF1 (Nutriment-deprivation autophagy factor-1), une protéine agissant comme un répresseur endogène de la macro-autophagie capable de dégrader des mitochondries ainsi que plusieurs constituants cellulaires. L'objectif de ce croisement est donc d'accroître l'autophagie dans le muscle dystrophique afin d'examiner l'impact sur le phénotypes mitochondrial. Le second modèle présente quant à lui une inactivation totale de l'expression du gène *Park2* codant pour la protéine PARKIN, une E3 ubiquitine ligase récemment impliquée dans la mitophagie. L'objectif de ce croisement est donc d'examiner plus spécifiquement le rôle d'une inhibition de la mitophagie sur le phénotype et mitochondrial.

Mots-clefs : DMD, Muscle, Autophagie, Mitophagie, *Park2*, *Naf-1*.

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE

1.1 description de la maladie

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) a été pour la première fois décrite en 1858 par le Dr Guillaume Duchenne [17].

La DMD est une maladie génétique infantile morbide. Un enfant mâle sur 3300 naît avec ce désordre génétique[18]. Cette maladie est due à une mutation du gène de la dystrophine, une protéine de structure majeure du muscle strié squelettique (figure 1.1).

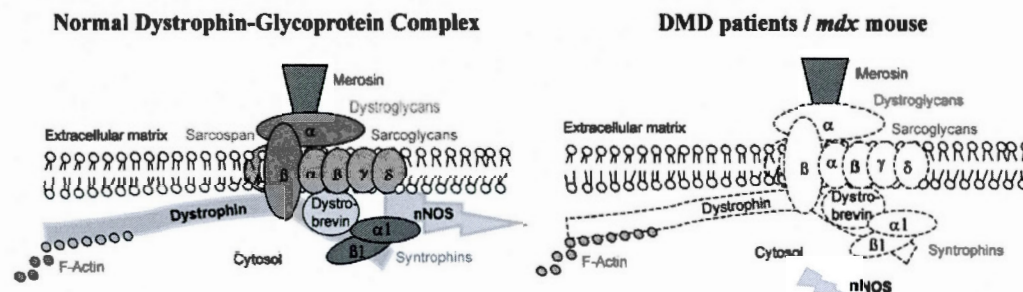


Figure 1.1 Localisation cellulaire de la dystrophine. Tiré de Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. Am J Phys Med Rehabil. Petrof B.J. 2002

La mutation intervient dans le chromosome X au locus p21.2 sur l'un des plus grands gènes (2,2 Mb) de l'ADN humain. De ce fait 99,8% des femmes porteuses de cette mutation ne présentent aucun symptôme. De rares désordres génétiques au niveau de l'inactivation du chromosome X, peuvent entraîner un phénotype musculaire caractérisé de faible à grave, bien que cette hypothèse ne soit pas relayée par toute la littérature [19].

Plusieurs types de mutation peuvent avoir lieu : la substitution, la délétion et la duplication. Ces mutations modifient le cadre de lecture menant à une traduction erronée, ou à l'introduction d'un codon stop qui termine la transcription, provoquant l'absence d'ARN ou d'un ARN tronqué.

Les troubles associés à cette maladie se présentent de manières chronologiques et localisées avec une progression disto-proximale. Les premiers signes cliniques apparaissent vers l'âge de 3 ans, et consistent en une hypertrophie des mollets, une

démarche anormale, et un syndrome de Gowers (figure 1.2), soit une parésie de la musculature proximale des membres inférieurs [20].

La dégradation de l'état de santé de l'enfant s'accélère entre 6 et 12 ans. La perte de masse musculaire mène à l'incapacité de marcher tandis que la rigidification des tendons entraîne des modifications de la posture, tel qu'une scoliose ou une cyphose. Lorsque la faiblesse musculaire atteint le tronc, apparaissent alors des troubles respiratoires et une faiblesse cardiaque entraînant la mort. L'espérance de vie des patients est en moyenne de 20 ans [21].

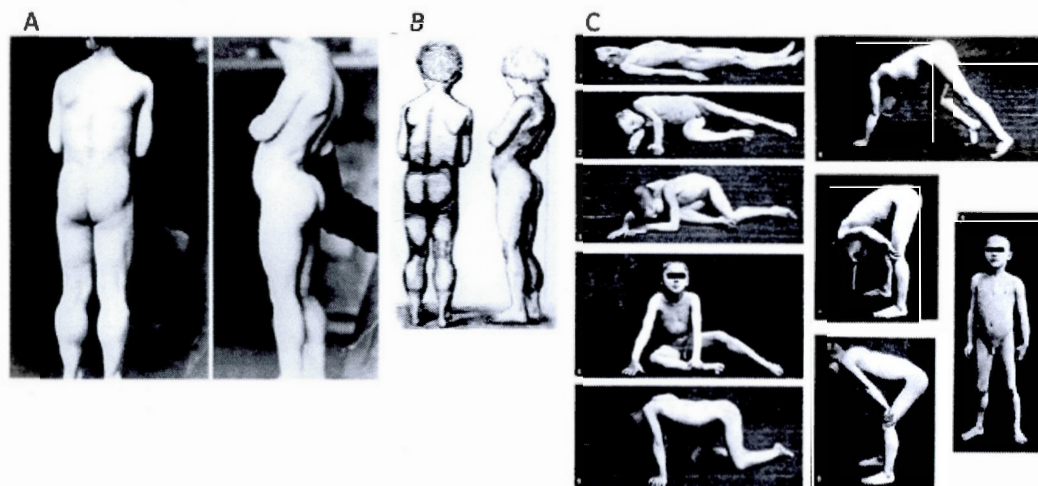


Figure 1.2 Représentations photographiques (A) et esquisses (B) de Joseph Sarrazin, premier cas identifié par Duchenne, issues de «Duchenne G.B.A, Album de photographes pathologiques. Paris : Baillière ; 1862 ». Représentation photographique du syndrome de Gowers (C), montrant l'incapacité de l'enfant à se lever à l'aide de ses jambes uniquement, issues de « Dejerine J, Trouble de la motilité. Sémiologie des affections du système nerveux. Paris : Masson; 1914 »

1.2 Traitements et avancées dans le domaine

Il n'existe pas aujourd'hui de traitement capable de guérir les patients, mais des méthodes permettant de retarder la progression de la maladie ou de soulager les patients [22] telles que les traitements aux corticostéroïdes, le port d'orthèses ou la kinésithérapie. Les traitements aux corticostéroïdes sont limités dans le temps dus à l'accoutumance des doses mais également aux effets secondaires (surpoids, dommages gastriques, ostéoporose, glaucome et cataracte). Le port d'orthèses et la kinésithérapie ne préviennent que peu l'apparition des symptômes. L'entraînement physique en endurance ou en résistance, permet aussi de renforcer la musculature et de prolonger la fonctionnalité musculaire des patients sans endommager les muscles[23, 24].

Depuis 1951, plus de 7800 articles ont été publiés dans des journaux scientifiques, démontrant ainsi l'intérêt du milieu médical et de la recherche scientifique de comprendre et traiter cette maladie. Malgré tous les efforts combinés aucune solution satisfaisante n'a pu être trouvée, mais grâce au progrès de la génétique, de l'approfondissement des connaissances physiologiques et métaboliques, la recherche avance vers une résolution de la pathologie.

De ces constats, deux modèles de souris ont été développés afin d'aider à la compréhension des mécanismes de la DMD, le modèle *mdx* et le modèle *mdx-utrn*^{-/-}.

En 1984, Bulfield [25] décrit le modèle de souris *mdx*. Cette souris est, comme l'Homme atteint de DMD, dépourvue de la dystrophine mais ne présente pas les mêmes symptômes que la DMD à cause de l'expression importante du gène de l'utrophine chez la souris. L'utrophine est une protéine de structure, capable de remplacer la dystrophine. Chez l'Homme, elle est localisée au niveau de la jonction neuromusculaire et sa faible expression ne permet pas de compenser l'expression déficiente de la dystrophine.

Les souris *mdx* vont subir des phases de nécroses musculaires accrues entre 3 et 6 semaines suivies d'une phase de régénération achevée vers 12 semaines. Vers 10 mois elles présentent un début de cardiomyopathie, et de changements morphologiques. Ainsi, il est important de considérer que la chronologie de la maladie chez la souris *mdx* est fortement décalée par rapport à celle chez l'Homme (figure 1.3). Bien que ce modèle ne soit pas parfait, il reste le plus utilisé et permet une meilleure compréhension des phénomènes qui se produisent chez l'Homme.

Les étapes clefs du développement de la maladie chez l'Homme (en noir). Dès 3 ans, apparition des premiers signes, et perte de la masse musculaire des jambes ; de 7 à 12 ans une perte drastique des fonctions de la marche, scoliose, et problèmes respiratoires ; À partir de 12 ans une cardiopathie létale vers l'âge de 20ans. Chez la souris (en vert) un pic de nécrose musculaire entre 3 et 6 semaines suivi d'une régénération complète à 12 semaines. Vers 10 mois l'apparition des premiers signes de cardiopathie, et enfin la mort vers 24 mois.

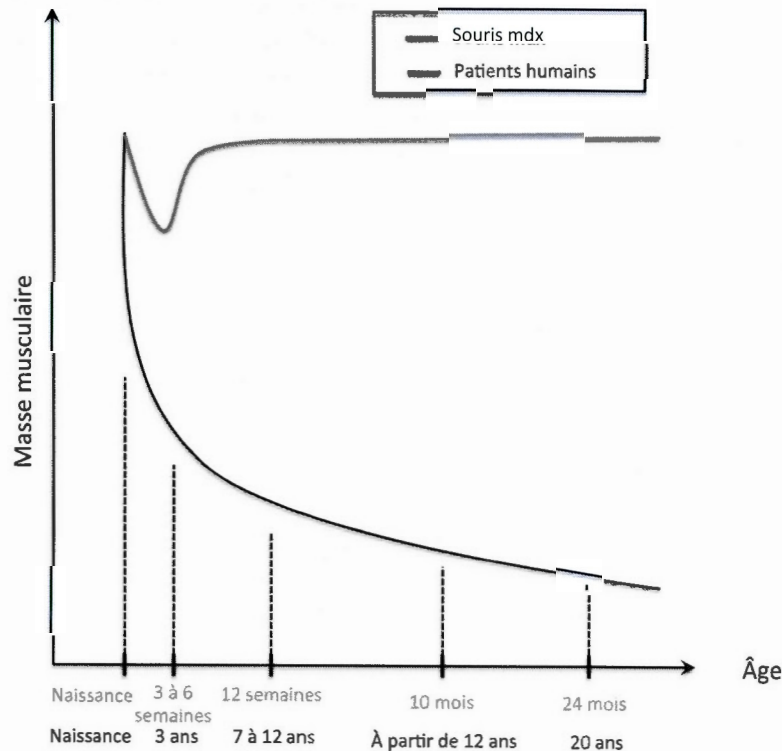


Figure 1.3 Parallèle entre l'étiologie de la DMD chez l'Homme et le modèle de souris mdx

Toutefois, afin de palier au problème de compensation de l'utrophine, une lignée transgénique issue du génie génétique a été développée par Deconinck en 1997 [26].

Cette nouvelle lignée appelée *mdx-utrn^{-/-}*, présente à la fois le génotype *mdx* et l'absence d'utrophine. Ces souris présentent un phénotype sévère qui les rend difficiles à maintenir en vie au-delà de 4 mois limitant la période dans laquelle elles peuvent être étudiées.

Grâce à ces modèles, on peut répertorier en 2014, cinq nouvelles thérapies novatrices qui, grâce aux progrès de la recherche médicale et pharmaceutique, sont au stade des essais cliniques. Ces traitements sont, le traitement viral, le TCRT (Termination codon read-through), « l' *exon skipping* », l'augmentation des niveaux d'utrophine et le « Knock-in » par recombinaison homologue [27-30]. Malgré des résultats prometteurs, les comités d'éthique sont très réticents à la modification, même ponctuelle, du génome humain, à cause du peu de recul dont la science dispose aujourd'hui concernant les effets secondaires potentiels.

Le traitement viral consiste à infecter le patient d'un virus modifié qui, une fois intégré, transcrit l'ARN d'une « mini-distrophine » pour remplacer la protéine manquante. Cette technique présente beaucoup de limitation technique, notamment la taille de l'insert, la réaction immune du patient et la potentielle faible longévité du traitement.

Le TCRT (*Termination Codon Read Through*) est une technique mise au point pour passer outre les codons stop, et ainsi continuer la transcription des ARN. Dans 15% des cas de DMD, il s'agit de l'apparition d'un codon stop au milieu de la séquence d'ADN, impliquant un arrêt précoce de la transcription, menant à l'impossibilité de la traduction d'une protéine fonctionnelle. La contrindication majeure des traitements TCRT est la toxicité des produits chimiques utilisés [22, 30].

« *L'exon skipping* », est en terme de technologie, une des technique de thérapie génique les plus avancée. Dans le cas d'un mauvais alignement du cadre de lecture, le

passage d'un exon spécifique, permet de réaligner la séquence et ainsi de produire une protéine fonctionnelle bien que tronquée [27, 29].

Le « Knock-in » par recombinaison homologue est une technique de chirurgie génétique extrêmement novatrice. Avec le concours d'endo-nucléases de synthèses, la partie mutée de l'ADN va être excisée, puis grâce à un lentivirus, un nouveau brin d'ADN complémentaire sera présenté au lieu de l'excision et introduit dans le génome [28].

Ces modèles ont également permis de confirmer les observations menées chez l'Homme et d'approfondir les connaissances à des niveaux moléculaires.

Plusieurs théories ont été émises quant aux mécanismes pathogéniques de la DMD et un consensus s'est bâti autour de quatre mécanismes résumés par Petrof [31] comme suit, l'affaiblissement du sarcolemme par les contraintes mécaniques, les messages cellulaires aberrants, la déstabilisation de la balance calcique et enfin l'augmentation du stress oxydant.

Premièrement, après la découverte de la dystrophine et de sa localisation subsarcolemmale [32, 33], les travaux d'Edwards [34] ont permis de voir émerger la théorie des dommages mécaniques qui explique les dommages musculaires des fibres déficientes en dystrophine par les contraintes mécaniques subies. Ces dommages entraînent des modifications de la structure du muscle et perturbent notamment l'organisation des mitochondries, des organelles essentielles à la contraction musculaire. Cette théorie de la mécano-transduction permet d'expliquer une partie

des dommages rencontrés chez l'Homme [35, 36] et l'animal [37-43] bien qu'elle ne fasse pas l'unanimité [41-43].

Deuxièmement la messagerie cellulaire est affectée à plusieurs niveaux. La dystrophine fait partie du complexe Dystrophine-Glycoprotéines et se fixe au niveau de la matrice extracellulaire aux β -dystroglycanes [44] où elle interagit avec de nombreuses protéines responsables de signaux cellulaires. La calmoduline [45], dont l'interaction avec le calcium permet d'activer de nombreuses voies métaboliques comme la glycogénolyse par l'activation de la phosphorylase kinase (Phk) [46, 47] et des canaux ioniques importants [48], trouve son expression fortement augmentée chez les patients DMD [49]. L'aggravation des symptômes lors de l'inhibition de cette voie de signalisation [50] suggère un mécanisme compensatoire.

La nNOS (neuronal nitric oxide synthase) [51] est une enzyme responsable de la synthèse de NO, un messager cellulaire essentiel sous contrôle du calcium et de la calmoduline [52]. Le NO régule de façon adaptative l'apport d'oxygène aux mitochondries [53] et inhibe l'activité de la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV en réponse à l'hypoxie [54] afin de limiter les dommages oxydatifs [55]. Ce système compensatoire est inhibé en l'absence de dystrophine du fait de la délocalisation membranaire de la nNOS vers le cytosol où son activité est fortement réduite chez l'Homme comme chez l'animal [56]

Troisièmement la dérégulation calcique [49, 57-60] est un point important dans la pathogenèse de la DMD, bien que ces résultats ne soient pas confirmés par toutes les études tant chez l'Homme que chez l'animal [61-64]. Si une perturbation généralisée de l'homéostasie calcique est sujette à débats, les influx aberrants de calcium ont eux été clairement identifiés. Cette perméabilité accrue au calcium est due aux dommages

mécaniques subit par les fibres, une perte de fonctions du réticulum sarcoplasmique (RS) [65] et l'altération de la fonction de canaux calciques [66-69].

L'absence de dystrophine dans le muscle strié squelettique humain entraîne la déstabilisation des triades [70, 71] mise en évidence par l'observation de l'anastomose du tubule T, du réticulum et de l'espace extracellulaire [72]. De plus on constate une modification des propriétés du réticulum sarcoplasmique [65], notamment une diminution de la capacité de rétention calcique basale et maximale. Toutefois l'efficacité de rétention calcique, mesurée comme le rapport du pompage de calcium sur l'activité ATPase n'est pas modifiée (figure 1.4).

Il a également été constaté des fuites de calcium par certains canaux ioniques sensibles aux déformations mécaniques (SAC Stretch-activated channel) chez les souris *mdx* et chez l'Homme [66-69]. L'entrée aberrante de calcium suite à la rupture des membranes stimule la calpaine, une protéase qui sous contrôle du calcium dégrade les SACs et provoque ces fuites calciques [73, 74]. Ce phénomène est exacerbé par la boucle de rétrocontrôle positif de relargage calcique.

Ces modifications structurelles et fonctionnelles entraînent une déstabilisation de l'homéostasie calcique [57, 75-77] aux abords du réticulum sarcoplasmique où se trouvent en grande quantité les mitochondries [78]. Bien que ces organelles aient la capacité de capter le calcium afin de maintenir l'homéostasie calcique [79], les flux calciques anormaux augmentent les dommages oxydatifs suite à l'activation de la chaîne respiratoire et stimulent l'ouverture du pore de perméabilité menant à la destruction des mitochondries [80]. La libération du calcium mitochondrial alimente alors le phénomène de déstabilisation de l'homéostasie calcique.

TABLE 3. *Studies on Fragmented Sarcoplasmic Reticulum.*

CASE No.	CALCIUM UPTAKE		ATPASE ACTIVITY	EFFICIENCY Ca ⁺⁺ /Pi
	INITIAL RATE*	TOTAL UPTAKE		
	$\mu\text{moles of calcium/mg of protein/ min}$	$\mu\text{moles of calcium/mg of protein/ 15 min}$	$\Delta\text{Pi, } \mu\text{moles/ mg of protein/ min}$	
Duchenne dystrophy:				
1	.08	.46	.29	.28
2	.16	.28	.23	.70
3	.09	.37	.21	.43
4	.35	1.38	.29	1.20
5	—	.43	.43	—
6	.20	.73	.40	.50
7	.30	.96	.47	.64
8	.13	.82	.73	.18
Mean — S.E.M.	.19 ± .04 p < .01	.68 ± .13 p < .001	.38 ± .06 p < .001	.56 ± .13 p < .40
Myotonic dystrophy:				
1	.60	3.10	1.20	.50
2	.60	2.10	.26	2.31
3	.52	1.76	.46	1.11
4	.41	1.50	.83	.49
Mean — S.D.	.53 ± .09 p < .02	2.12 ± .68 p > .80	.69 ± .42 p > .40	1.10 ± .43 p < .2
15 Normal patients	.38 ± .03	2.04 ± .15	.84 ± .04	.43 ± .15

*Over 1st 2½ min of uptake.

Figure 1.4 Modifications des paramètres fonctionnels du réticulum sarcoplasmique dans un contexte myopathique. Tiré de Biochemical Abnormalities of the Sarcoplasmic Reticulum in Muscular Dystrophy. The new England journal of medicine. Samaha Frederick J. 1969

Finalement le stress oxydant est également une source de dommages pertinent à considérer dans un contexte dystrophique [81-84]. Les évidences d'un haut taux de dommages oxydatifs chez les patients atteints de DMD comme chez les souris *mdx*, tant en termes de dommages [8, 85-87] que de réponses des systèmes antioxydants [8, 87, 88] tendent à montrer que les ROS (reactive oxygen species) tiennent une place importante dans la pathogenèse de la DMD. Ces ROS peuvent provenir de plusieurs sources dont en premier lieu le système immunitaire recruté au niveau des zones de nécrose.

En effet NF- κ B (Nuclear factor Kappa B) est un facteur de transcription des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Tumor necrosis factor α) dont l'activité est fortement augmentée dans un contexte de DMD [89]. Or TNF- α est connu pour stimuler la production de ROS mitochondriale [90]. De plus les macrophages largement présent dans les muscles de souris *mdx* sont capables *in vitro* de lyser des myotubes par un mécanisme radicalaire [91] et leur inactivation permet de limiter cette destruction [92]. Enfin les ROS produit par les neutrophiles et macrophages présents dans des zones de nécrose, sont habituellement pris en charge par le NO provenant de la Nitrique Oxyde Synthase neuronale (nNOS) [93] dont l'activité est considérablement diminuée avec la perte d'expression de la dystrophine.

La nNOS est une enzyme produisant de l'oxyde nitrique, un messenger et un antioxydant cellulaire important qui se fixe indirectement sur la dystrophine via l' α -syntrophine [94]. Cette enzyme génère également en présence de l'anion super-oxyde des peroxy-nitrites (RNS) agissant comme des ROS. En l'absence de la dystrophine, cette enzyme est délocalisée dans le cytosol et peu active [94] entraînant la diminution et la délocalisation de la production de NO.

Toutefois, bien que la gravité de la pathologie soit corrélée à l'absence de cette enzyme [95], ni sa délocalisation [96] ni la production de RNS [97] n'entrent directement dans la pathogenèse de la DMD. Il a été démontré que le rétablissement des taux de NO₂ ainsi que la stimulation de la NOS par son substrat la L-Arginine chez les souris *mdx* permettent de diminuer le dommage oxydatif et l'inflammation, mais aussi de stimuler la régénération et l'activation des cellules satellites [98-100]. De plus, la stimulation de la nNOS par l'implantation d'un transgène sur un fond *mdx*, permet de limiter l'invasion de macrophages, de diminuer les dommages cellulaires et d'améliorer le phénotype musculaire [92]. Trois mécanismes sont proposés pour expliquer les améliorations suivantes la stimulation de l'enzyme ou l'augmentation des taux de NO, la stabilisation de l'utrophine à la membrane [101, 102], l'effet antioxydant du NO mais également sa fonction de messenger cellulaire auprès des macrophages [92].

Une autre enzyme, la NADPH-oxydase, présente également un potentiel oxydatif fort [103] dans le contexte de la DMD [104] et chez la souris *mdx*, où l'expression de ses sous-unités catalytiques et régulatrices [97, 105] ainsi que son activité sont fortement augmentées dans le cœur [105] et le muscle strié squelettique [84].

Les influx aberrants de calcium constatés déclenchent la production de ROS endogènes [88, 106] par les mitochondries [5].

Il a aussi été constaté qu'en plus d'une forte production de ROS, les fibres musculaires présentent une plus grande fragilité face au stress oxydant [107, 108] dès les premiers stades chez la souris *mdx* en particulier [8].

Les traitements aux antioxydants diminuent l'inflammation, favorisent la régénération des tissus musculaires et diminuent l'impact des dommages [109-112] confirmant le rôle des ROS dans la pathogenèse de la DMD. Toutefois certaines études [2] dont des études cliniques ne retrouvent pas ces résultats [113, 114]

suggérant ainsi que les dommages oxydatifs ne soient qu'une étape dans la cascade d'évènements pathogéniques.

La mise en place de la pathologie de la DMD est donc un mécanisme multifactoriel et séquentiel initié par la fragilisation de la membrane plasmique due à l'absence de dystrophine et la modification de la messagerie cellulaire, menant à une déstabilisation de l'homéostasie calcique et de la production de ROS. Tout au long de ce mécanisme, les mitochondries subissent des dommages structuraux et l'étude des modifications de leurs capacités fonctionnelles est nécessaire pour la compréhension du rôle des mitochondries dans la pathogenèse de la DMD.

CHAPITRE II

BIOLOGIE MITOCHONDRIALE ET SON RÔLE DANS LA PATHOGENÈSE DE LA DMD

Plusieurs évidences expérimentales obtenues tant chez l'animal que chez l'Homme ont démontré l'existence de dysfonctions mitochondriales multiples dans le muscle dystrophique [3, 5, 115-121]. De plus, des études récentes, portant principalement sur des modèles animaux de la DMD, ont démontré que des approches pharmacologiques ou génétiques visant à limiter les dysfonctions mitochondriales permettaient de ralentir la pathologie musculaire [3, 122-124]. La section qui suit présente donc un bref rappel des fonctions mitochondriales pertinentes ainsi qu'une revue des preuves supportant le rôle des dysfonctions mitochondries dans la pathogenèse de la DMD.

2.1 Les fonctions mitochondriales en situation physiologique

La mitochondrie est une organelle endosymbiotique issue d'une archéobactérie aérobic. Semi-autonome, elle possède son propre ADN (ADNmt), constitué d'un double brin circulaire de 16,6 Kb, codant pour 13 protéines, 2 ARNr (12S et 16S) et 22 ARNt.

Elle se compose de deux membranes phospholipidiques, la membrane externe et la membrane interne séparant le cytosol, l'espace inter-membranaire (EIM) et la matrice mitochondriale.

2.1.1 Production d'énergie

Cette organelle a pour charge majeure dans la cellule de fournir l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Pour se faire, la mitochondrie utilise les substrats énergétiques issus de la glycolyse [125] et de la beta-oxydation [126], des acide-gras via le cycle de Krebs. Une chaîne de transporteurs d'électrons au sein de laquelle se déroule une cascade de réactions d'oxydo-réduction des substrats permet de générer un gradient de proton entre l'EIM et la matrice mitochondriale. Cette chaîne se compose de quatre complexes, enchâssés dans la membrane interne dont les multiples sous-unités sont encodées par l'ADN nucléaire (nDNA) et /ou l'ADN mitochondrial (mtDNA) (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Tableau de l'origine des protéines des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase

Complexes	I	II	III	IV	
Nom	-NADH ubiquinone oxydoreductase - NADH deshydrogenase	Succinate dehydrogenase (SDH)	Ubiquinone cytochrome c réductase	Cytochrome c oxidase (COX)	F ₁ -F ₀ ATP synthase
Notation	EC 1.6.5.3	EC 1.3.5.1	EC 1.10.2.2	EC 1.9.3.1	EC 3.6.3.14
Nombres de protéines	44	4	22 (dimère de 11)	14 (dimère de 7)	40-50 (stoechiométrie variable)
Nombres de protéines mitochondriales	7	0	1	3	2
Nombres de protéines nucléaires	37	4	10	4	13
Poids moléculaire en kDa	800	130	300	200	550-650

Cette chaîne est composée de la NADH ubiquinone oxydo-réductase (CI) dont le substrat est le NADH, la succinate déshydrogénase (SDH, CII) qui a pour substrat le FADH, l'ubiquinone cytochrome C réductase (CIII) qui transfère les électrons de l'ubiquinone au cytochrome C et enfin la cytochrome C oxydase (COX, CIV) qui utilise les électrons pour catalyser la réaction finale menant à la consommation d'oxygène et la production d'eau (Figure 2.1).

Le gradient de proton généré par la chaîne respiratoire se traduit en deux composantes majeures, un gradient chimique et un gradient électrique qui génèrent un potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) qui est utilisé comme moteur pour de multiples mécanismes de transport actif au sein de la mitochondrie ainsi qu'à la synthèse d'ATP au niveau de la F_0-F_1 ATP synthase.

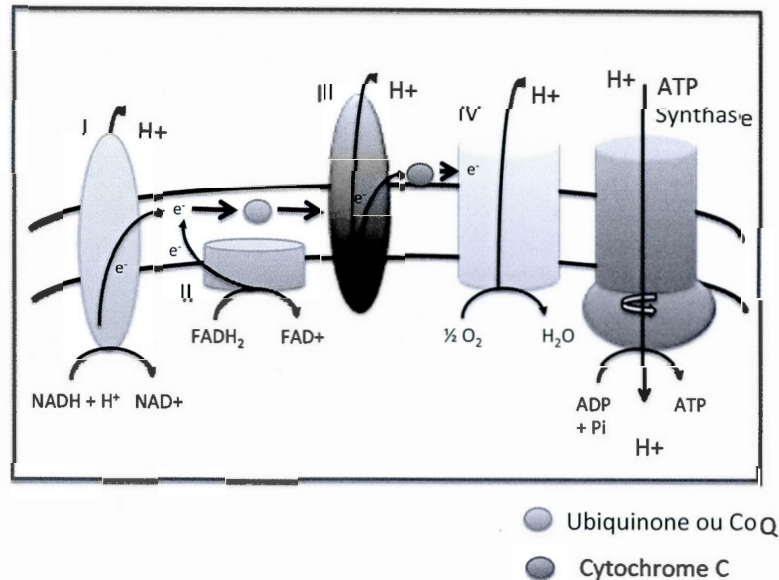


Figure 2.1 Représentation schématique de la chaîne respiratoire. Inspiré de Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. Physiology.

O'Rourke B. 2005

Ce potentiel de membrane est d'environ 160 mV auxquelles s'ajoutent environ 60 mV associé au gradient de pH (ΔpH) entre les milieux inter et intra-membranaires. Ce potentiel électrique attire à la mitochondrie de nombreuses molécules chargées positivement dont le Ca^{2+} . Les entrées de calcium ont pour conséquences une modification du potentiel de membrane associée à une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire. Les mitochondries possèdent des transporteurs de calcium afin de réguler leur homéostasie calcique et par extension celle de la cellule.

2.1.2 Homéostasie calcique

Les signaux calciques sont au niveau de la cellule un messenger secondaire important notamment dans le phénomène de contraction musculaire et d'apoptose. La mitochondrie a un rôle de tampon, grâce à sa capacité de stockage du calcium qui permet de limiter la concentration cytosolique en cas d'augmentation massive de la concentration calcique. Dans la mitochondrie, le calcium agit également comme un stimulateur des voies métaboliques productrices d'énergie, permettant ainsi un couplage du métabolisme avec les processus consommateurs d'ATP dépendants du Ca^{2+} . Toutefois, lorsque la capacité de rétention est excédée, la mitochondrie relargue le calcium en ouvrant son pore de transition de perméabilité. La décharge calcique et le relargage cytosolique de certains facteurs comme le cytochrome C suivant l'ouverture du pore par la mitochondrie, contribuent à l'initiation de mécanismes apoptotiques et nécrotiques.

2.1.3 Stress oxydant

La respiration mitochondriale est également source de stress oxydant [127]. Différents mécanismes de fuite d'électrons mènent à la génération d'anion super oxyde qui potentiellement peuvent endommager protéines, lipides et ADN. Ces ROS sont pris en charge par des enzymes anti-oxydantes dont la MnSOD, la peroxyredoxine ou la Glutathion reductase afin de les changer en H_2O_2 . Ce système de détoxification peut néanmoins être dépassé par une production trop importante de ROS, c'est alors qu'on parle de stress oxydatif.

L'anion super-oxyde peut être également transformé par la *Nitric Oxyde Synthase* (NOS) en radical libre nitré, tels les peroxy-nitrites.

Les ROS comme les RONS présentent un risque de dommage oxydatif à des niveaux élevés mais lorsque ces derniers sont présents à de plus faibles niveaux, ce sont des messagers cellulaires essentiels.

2.1.4 Mort cellulaire

De forts taux de stress oxydatif, une augmentation importante du calcium intracellulaire, et une dérégulation mitochondriale peuvent mener à la libération de facteurs pro-apoptotiques et initier le processus de mort cellulaire. Dans ce processus la mitochondrie libère du cytochrome C, et déclenche une cascade de réactions enzymatiques conduisant au programme apoptotique et nécrotique [128, 129]. D'autres mécanismes indépendants de la rupture de l'intégrité membranaire des mitochondries permettent d'initier l'autophagie par la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol [130, 131].

La mitochondrie est donc une organelle essentielle de la cellule, responsable de la production d'énergie, du maintien de l'homéostasie calcique et d'une part importante de la messagerie cellulaire. En situation physiopathologique elle est également responsable de dommages oxydatifs et de l'initiation de la mort cellulaire apoptotique. De manière intéressante, le déficit énergétique, le stress oxydant et la perturbation de l'homéostasie calcique sont des phénomènes retrouvés dans le muscle

dystrophique [106, 115, 118], suggérant que les mitochondries représentent des cibles et des sources de dommages.

2.2 Rôle de la mitochondrie dans la pathogenèse de la DMD

Plusieurs études se sont spécifiquement intéressées à caractériser la fonction mitochondriale dans le muscle dystrophique. De manière schématique, les études disponibles se sont concentrées sur 1) l'aspect bioénergétique et métabolique, 2) le stress oxydant et 3) l'homéostasie calcique et la signalisation de la mort cellulaire.

2.2.1 Les dysfonctions énergétiques et métaboliques

Chez l'Homme, bien que des analyses en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) n'aient pas permis de clairement mettre en évidence une dysfonction mitochondriale dans le muscle de patient DMD [132], plusieurs études utilisant des techniques plus directes ont mis en évidence des défauts de phosphorylation oxydative [115-117]. Toutefois ce défaut ne se retrouve pas dans des formes moins graves de dystrophinopathies comme la dystrophie musculaire de Becker (DME)[133].

Ces mêmes défauts se retrouvent chez l'animal au niveau des complexes I et II [118] mais également du complexe IV comme le montrent les travaux de Kusnetsov *et.al.* dans le muscle strié squelettique de souris *mdx* mais pas dans le cœur [134]. Ces données sont confirmées par des études conduites dans notre laboratoire [2, 3]. Ces

déficits ne sont pas uniquement dus à une perte de fonctionnalité des complexes de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs [3, 5, 117, 120, 121], mais peuvent aussi provenir d'un appauvrissement du nombre de mitochondries [2, 3].

Bien qu'il existe une littérature en opposition à ces données [84, 135] due à des variations expérimentales tels l'âge et les muscles étudiés, il existe de fortes évidences concernant des dysfonctions mitochondriales chez les patients dystrophiques et chez la souris *mdx* entre 6 et 12 semaines.

De plus, il a été observé que le métabolisme énergétique chez les patients atteint de DMD est diminué [6]. En effet, les substrats énergétiques sont présents en moins grande quantité, tant au niveau du métabolisme glycolytique que celui des acides gras. Un défaut de la carnitine, une molécule responsable du transport des acides-gras à la mitochondrie pourrait en être responsable [136]. Ainsi, l'absence de la dystrophine chez l'Homme comme chez la souris entraîne sur le plan énergétique d'importantes dysfonctions mitochondriales et métaboliques qui peuvent être rétablies par la stimulation mitochondriale. Il est également démontré que ces dysfonctions mitochondriales entraînent une augmentation du stress oxydant et des dommages cellulaires.

2.2.2 Le stress oxydant dans la pathologie de la DMD

C'est en 1965 que Binder [137] établit un lien théorique entre le stress oxydatif observé chez des patients atteints d'une déficience en α -tocophérol et ses observations sur les patients atteints de DMD. De nombreuses études se sont alors

intéressées au rôle du stress oxydatif lié à l'absence de la dystrophine chez l'Homme. Les mesures des taux de o-tyrosine [84] et de carbonyles [85, 87, 138, 139] attestent que le stress oxydant et les dommages sont plus élevés chez l'Homme et chez la souris atteints de DMD. En plus d'une présence de radicaux libres plus élevée dans les dystrophinopathies il est clairement établi que les cellules musculaires présentent une plus grande sensibilité aux dommages oxydatifs, chez la souris *mdx* [8, 97, 108, 140, 141].

Or la production de radicaux libres provient de quatre sources précédemment décrites dont le système immunitaire, la délocalisation de la nNOS, l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale.

Au niveau mitochondrial, il est bien admis que les principaux sites responsables de la production de ROS sont les complexes I et III de la chaîne respiratoire, où environ 2% du flux d'électrons est susceptible de réagir directement avec l'O₂ pour générer l'anion superoxyde [142, 143].

À l'état basal et dans différents groupes musculaires il n'existe aucune évidence d'une surproduction de ROS chez la souris *mdx* [2]. L'augmentation de la production de super-oxydes mitochondriaux chez la souris *mdx* est dépendante d'un stress mécanique [97] et d'évènements calciques afférents [144-147].

Les dommages oxydatifs touchent les organelles, les protéines mais aussi l'ADN mitochondriale faiblement protégé [148]. La modulation grâce à des antioxydants tels

que le Resveratrol [123, 149, 150], la N-acétylcystéine [111, 112] ou l'IRF1042 [110], du dommage oxydatif chez les souris *mdx* ont permis de restaurer chez ces souris de meilleures conditions musculaires, en terme de structure, de force et de régénération. D'une façon surprenante il a également été décrit que les fonctions de détoxification de la cellule et de la mitochondrie sont plus élevées chez les souris *mdx* comme le démontrent les travaux Kaczor [9] sur les différentes SOD (SOD1/2, CU/Zn-SOD, MnSOD), ou ceux de Menazza [151] sur la monoamine oxydase.

Malgré une surexpression des enzymes responsables de la dégradation des RO/NS, les dommages oxydatifs importants subis par les patients atteints de DMD et les souris *mdx* dus, à 1) l'activité radicalaire des macrophages en l'absence de la nNOS 2) à l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et 3) à l'augmentation de ROS mitochondriaux en réponse aux stress mécanique et calcique, aggravent sévèrement le phénotype musculaire et gênent la régénération.

Des études suggèrent un lien étroit entre le stress oxydant et les anomalies calciques dans la DMD [97, 111] et proposent une boucle de rétrocontrôle positif entre ces deux événements.

2.2.3 L'homéostasie calcique et les messagers pro-apoptotiques dans la DMD

Les problèmes d'homéostasie calcique chez les patients atteints de DMD et les souris *mdx* sont comme le suggère Gillis [152] malgré une littérature fournie, pauvrement compris. L'étendue et la variété des résultats sur le sujet du contenu calcique

intracellulaire dans les fibres musculaires dystrophiques sont principalement dues aux différences de protocoles et de sondes comme en atteste le tableau 2.2 [152].

Tableau 2.2 Comparaison des méthodes de mesures du calcium intracellulaire chez les souris mdx ou des patients atteints de DMD ainsi que les résultats obtenus. Tiré de Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review.

Gillis Jean-Marie.1996

Table 1 Survey of $[Ca^{2+}]_i$ values (nM, mean \pm SEM) in preparations from mdx mice

Preparations	Ca^{2+} indicator	$[Ca^{2+}]_i$ control	$[Ca^{2+}]_i$ mdx	References
Myotubes	Fura-2-AM	154 \pm 33	159 \pm 34	(1)
Interosseus muscle	Fura-2-AM	48 \pm 30	39 \pm 7	(1)
Myotubes	Fura-2 ionoph.	66 \pm 6	134 \pm 9	(3)*
Flexor digitorum brevis	Fura-2 ionoph.	46 \pm 4	46 \pm 4	(4)
Myotubes	Fura-2-AM	62 \pm 2	91 \pm 4	(2)*
Flexor digitorum brevis	Fura-2 inject.	40 \pm 3	92 \pm 10	(5)*
Flexor digitorum brevis	Fura-2-AM	120	150	(6)*
Flexor digitorum brevis	Fura-2-AM	45 \pm 4	45 \pm 3	(7)
Soleus	Fura-2-AM	125 \pm 9	123 \pm 12	(7)
Smooth muscle	Fura-2-AM	102 \pm 7	104 \pm 9	(8)

(1) Pressmar *et al.* (1994); (2) Denetclaw *et al.* (1995); (3) Bakker *et al.* (1993); (4) Head (1993); (5) Turner *et al.* (1988); (6) Turner *et al.* (1991); (7) Gailly *et al.* (1993a); (8) Boland *et al.* (1993).

* Significant difference between control and mdx values.

Inject.: pressure injection; ionoph.: ionophoresis injection; AM: acetoxyethyl ester derivative.

Table 2 Survey of $[Ca^{2+}]_i$ values (nM, mean \pm SEM) in preparations from DMD patients

Preparations	Ca^{2+} indicator	$[Ca^{2+}]_i$ control	$[Ca^{2+}]_i$ DMD	References
Myoblasts	Indo-1AM	37 \pm 5	89 \pm 9	(9)*
Myotubes	Indo-1AM	36 \pm 4	44 \pm 4	(9)
Myotubes	Quin-2AM	169 \pm 34	303 \pm 83	(10)*
Myoblasts	Fura-2-AM	183 \pm 39	174 \pm 43	(1)
Myotubes	Fura-2-AM	104 \pm 26	97 \pm 25	(1)

(1) Pressmar *et al.* (1994); (9) Rivet-Bastide *et al.* (1993); (10) Mongini *et al.* (1988).

* Significant difference between control and mdx values.

Si aucun consensus sur le contenu total de calcium intracellulaire plus élevé [59, 64, 106, 153] ou non [57, 97, 147, 154] ne semble se faire, les flux aberrants de calcium suivant une contrainte mécanique sont quant à eux bien admis [97, 147, 155] et schématisés par Allen [156] (figure 2.2)

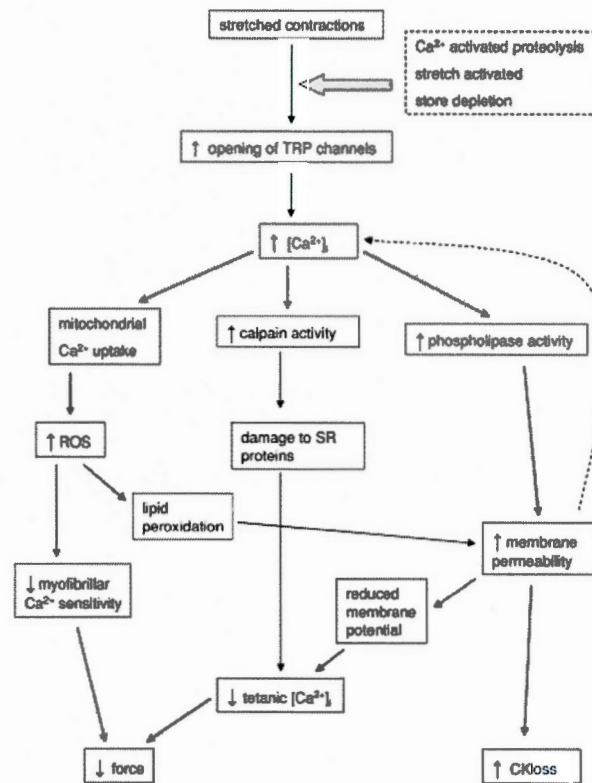


Figure 2.2 Schématisation des voies stimulées par les dommages musculaires induits par les contraintes mécaniques. Tiré de Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. Journal of physiology. Allen D.G .2005

Les causes de ces entrées aberrantes de calcium peuvent être, comme vu précédemment 1) la déstabilisation du réticulum sarcoplasmique [65, 72], 2) la sur-activation des canaux calciques sensibles à l'étirement (SACs) [11, 157], des canaux calciques réserves dépendants (SOCs) [158-160], et des récepteurs à la ryanodine [161].

Par ailleurs, on constate un dérèglement calcique chez l'Homme [106, 118], tout comme chez la souris [60, 61], en particulier une diminution de certaines protéines responsables du stockage du calcium la calsequestrine et la sarcalumenine [162, 163] mais également de la regucalcin (ou senescence marker protein-30 (SMP-30) [164] impliquée dans le transport du calcium [165].

Ces entrées de calcium anormales peuvent avoir pour conséquence des pics de production d'anion super-oxyde par la mitochondrie [145] mais également provoquer l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) [166].

Les mitochondries peuvent stocker d'importantes quantités de calcium [167-170] et ont un rôle tampon pour la cellule [171-174], notamment lors de la dépolarisation du tubule-T [79]. Il existe un mécanisme permettant à ces organelles de libérer les excédants de calcium par un pore, le PTP, dont l'ouverture et la fermeture rapide permettent de rétablir l'homéostasie calcique mitochondriale tout en conservant le contenu mitochondrial.

Lors de surcharges calciques, ce pore reste ouvert et libère le Ca^{2+} et le contenu mitochondrial. Ce mécanisme en plus d'être sous le contrôle du calcium [80, 175, 176], est dépendant également des ROS [177], et la réduction du stress oxydatif permet d'atténuer la libération de Ca^{2+} par le muscle et augmente la capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale [97]. Chez la souris *mdx*, il a été montré que l'ouverture du PTP est plus sensible que chez les contrôles mais que la stimulation de la biogenèse mitochondriale par la surexpression de PGC1- α permet de rétablir cette variable selon des travaux menés au laboratoire [3]. L'inhibition de ce pore de perméabilité permet chez la souris *mdx* de diminuer la fibrose et les dommages observés au niveau du muscle squelettique [178].

En plus de la décharge calcique déstabilisant l'homéostasie de la cellule, la mitochondrie va relâcher des signaux pro-apoptotiques tels que l'endo-nucléase G (EndoG), le cytochrome c et l'Apoptosis inducing factor (AIF) qui activeront la messagerie apoptotique. On constate chez les jeunes souris *mdx* (4 semaines) comme chez les souris plus âgées une plus grande quantité de cellules musculaires apoptotiques avant l'apparition de nécrose [179]. Ce phénomène se retrouve également chez l'Homme atteint de DMD [180]. On observe également chez les souris *mdx* un profil d'activation apoptotique plus élevé [3, 141] et notamment l'activation de c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK) qui serait fortement impliquée dans la pathogenèse de la DMD [181]. Toutefois l'inhibition de l'apoptose n'améliore pas le phénotype [182].

Les conséquences mitochondriales d'une dérégulation cellulaire du calcium sont importantes à considérer dans le contexte de la DMD. Si les causes de cette dérégulation ne sont pas premièrement dues aux mitochondries, celles-ci s'inscrivent dans une boucle de rétrocontrôle positif alimentée par la diminution des fonctions bioénergétiques et métaboliques mitochondriales, et ainsi que l'augmentation de la production des ROS qui potentialise la sensibilité des mitochondries aux variations du calcium. Ceci a pour conséquence une plus grande perturbation calcique et la libération des facteurs apoptotiques.

D'une manière générale, la littérature nous enseigne que les dysfonctions mitochondriales et métaboliques observées chez les patients atteints de DMD et les souris *mdx*, ainsi que les hauts taux de stress oxydants et la dérégulation calcique sont au centre de la pathogenèse de la DMD. La stimulation des fonctions

mitochondriales, la diminution du stress oxydant et l'inhibition du PTP permettent d'améliorer la pathologie musculaire chez la souris *mdx*.

On observe également que la réduction de l'inflammation et de la nécrose permet d'améliorer le phénotype musculaire.

D'un point de vue thérapeutique il serait intéressant de considérer une stratégie complémentaire qui viserait à réduire les zones endommagées.

L'autophagie est un système de dégradation des protéines et organelles dysfonctionnelles, et l'étude de ce mécanisme cellulaire dans les modèles de DMD permettrait d'élaborer de nouvelles interventions visant à réduire les dommages cellulaires et d'améliorer la condition musculaire des patients.

CHAPITRE III

AUTOPHAGIE, MITOPHAGIE ET RÔLE DE CES PROCESSUS DANS LA PATHOLOGIE DE LA DMD

La section précédente a fait état de l'importance des mitochondries dans un contexte physiologique ainsi que de leurs rôles dans la pathophysiologie de la DMD. Considérant les dommages structuraux, oxydatifs et protéolytiques subis par les muscles dystrophiques au cours des phases de dégénérescence, il est pertinent de considérer les mécanismes impliqués dans la réparation cellulaire, notamment celui de l'autophagie qui s'avère jouer un rôle important dans le recyclage des structures endommagées.

Cette section de la revue est donc consacrée au rôle de l'autophagie dans le muscle squelettique et s'articule en trois parties. La première partie présente une description générale de l'autophagie et de ses mécanismes. La seconde partie porte plus spécifiquement sur les différents rôles de l'autophagie dans le muscle strié et sur les conséquences de sa dérégulation dans la DMD ainsi que d'autres pathologies musculaires pertinentes. Enfin une troisième partie est consacrée à la mitophagie, un processus autophagique plus sélectif récemment mis en lumière, mais dont le rôle dans le muscle est peu connu.

3.1 Autophagie : mécanismes et voies moléculaires

Dans sa première description et sa sémantique, l'autophagie fait référence au mécanisme naturel dont les cellules eucaryotes disposent afin de maintenir l'homéostasie cellulaire par la dégradation des protéines. Les premières preuves de l'autophagie ont été amenées en 1957 par Clark [183], dans son étude de la maturation rénale de rats nouveaux nés, basée sur la microscopie électronique. Il décrit des corps ronds et denses ressemblant à des mitochondries (donc pourvus d'une double membrane) mais sans structure telle que les crêtes. Le principe de l'autophagie est énoncé par De Duve en 1966 [184] en relation étroite avec ses précédents travaux menés avec Novikoff [185] et les travaux d'Ashford et Porter [186].

Dans sa description la plus moderne, l'autophagie est un mécanisme élaboré et multiple qui non seulement permet à la cellule de subvenir à ses besoins énergétiques en cas de privation de nutriments mais également la dégradation d'un éventail d'éléments dysfonctionnels allant de la protéine à l'organelle en passant par l'ARN [187]. D'un modèle de dégradation simple et général, l'autophagie est aujourd'hui décrit comme un système complexe, modulable par de nombreuses voies moléculaires qui peuvent intervenir non seulement en cas de jeûne, qui constitue le stimulus autophagique le mieux étudié et compris, mais également en réponse aux infections, et aux dommages causés par le stress et les altérations cellulaires [188].

L'autophagie peut se résumer à une action très générale de dégradation de groupement de protéines, ou une action plus spécifique concernant des protéines ou

des organelles ciblées [189]. Elle peut être séparée en plusieurs sous-types dont, la macro-autophagie, et la micro-autophagie décrites par De Duve et Wattiaux et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes décrites par Dice [190]. Ce chapitre se concentrera sur les mécanismes de la macro-autophagie (appelée autophagie dans ce mémoire), qui sont plus spécifiquement étudiés dans le muscle squelettique.

De manière générale l'autophagie est un processus requérant de l'énergie et qui se caractérise par la formation à partir des membranes d'organelles environnantes, d'une vésicule à double paroi autour du contenu cellulaire à dégrader. Subséquemment, cette vésicule autophagique appelée auto-phagosome, fusionne avec les lysosomes où la dégradation du contenu vésiculaire est assurée par les diverses enzymes lysosomiales. La caractérisation des mécanismes moléculaires régissant ce processus s'est initialement faite chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*. Le travail réalisé sur cet organisme plus simple a permis d'identifier 35 gènes essentiels au déroulement de l'autophagie : les *Autophagy related Genes* ou *Atgs* [191, 192]. Des travaux ultérieurs ont démontré que les *Atgs* sont des protéines hautement conservées qui se retrouvent chez les mammifères où plusieurs homologues formant le noyau de la machinerie autophagique ont été identifiés.

De manière simplifiée, le processus autophagique peut être divisé en quatre grandes étapes (Figure 3.1) incluant : **1)** l'initiation et la formation du site d'assemblage du phagophore (le PAS : *Phagophore Assembly Site*) **2)** l'élongation et la fermeture de l'autophagosome, **3)** la maturation de l'autophagosome via la fusion avec le lysosome, et **4)** la dégradation et le recyclage du cargo autophagique par les enzymes lysosomiales. Ces étapes sont en outre, soumises à une régulation par des stimuli et

des voies de signalisation complexes qui agissent à différents niveaux de cette cascade d'événements.

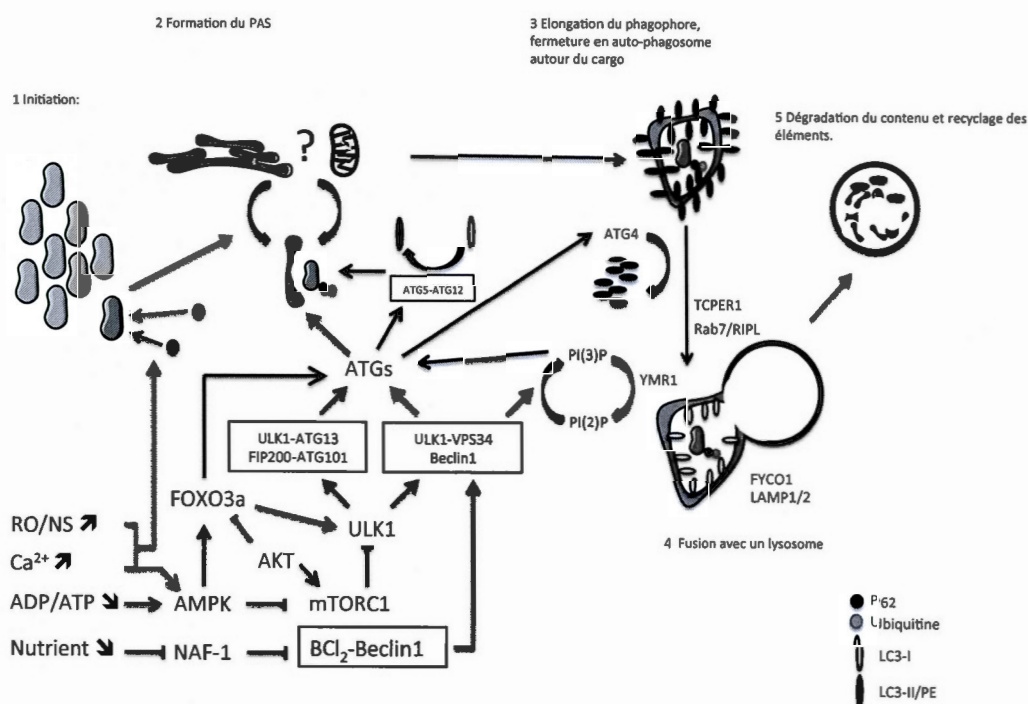


Figure 3.3 Représentation schématique des phases de l'autophagie. Inspiré de Definition, Molecular Machinery, and Potential Role in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics.2010. Dong Yi.

3.1.1 Formation et maturation de l'auto-phagophore : du PAS au lysosome

3.1.1.1 Reconnaissance et sélection du contenu cellulaire à dégrader

L'étape d'initiation consiste essentiellement en la reconnaissance du contenu cellulaire à dégrader. De manière générale, cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles, notamment l'ubiquitination des protéines, qui est catalysée par une variété d'ubiquitine-ligase au sein de la cellule. Ces modifications permettent dans un second temps le recrutement de la protéine P62/SQSTM1 [193, 194]. Cette protéine agit comme intermédiaire puisqu'elle possède à la fois un site d'interaction à l'ubiquitine lui permettant de se lier au contenu cellulaire à dégrader, et un site de liaison à la protéine LC3 (un homologue d'ATG8) qui est présente à la surface du PAS naissant [195]. De ce fait P62/SQSTM1 joue un rôle d'adaptateur permettant la sélection du contenu cellulaire à dégrader.

3.1.1.2 Recrutement des précurseurs membranaires

Cette étape de reconnaissance est suivie par la formation du PAS, étape au cours de laquelle les précurseurs membranaires nécessaires à la formation de la double membrane du futur autophagosome vont s'assembler à proximité de contenu cellulaire à dégrader. Les membranes nécessaires à la formation de ce PAS peuvent provenir de plusieurs sources. Chez les mammifères, il a été démontré que le

réticulum endoplasmique joue un rôle prépondérant, notamment dans des situations de privation nutritionnelle (figure 3.2) [196-199].

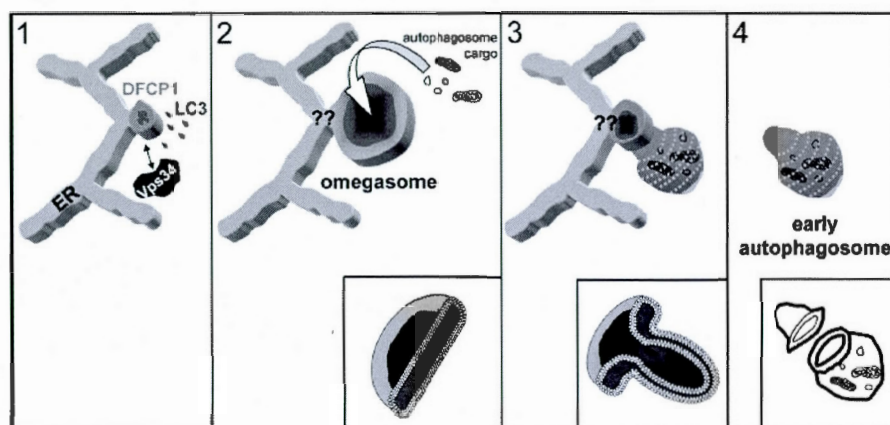


Figure 3.4 Formation de l'autophagosome à proximité du réticulum endoplasmique. Tiré de Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. The Journal of Cell Biology. Axe, Elizabeth L. 2008

Des évidences indiquent également que les auto-phagosomes pourraient se former à partir des membranes mitochondriales [200]. Dans ce processus, les mitochondries ne sont pas elles-mêmes dégradées et agissent strictement à titre de pourvoyeuses de membranes. De manière intéressante, la formation d'auto-phagosomes à partir des membranes mitochondriales semble dépendante de la mitofusine 2 (MFN2) une protéine impliquée dans les processus de fusion et fission du réseau mitochondrial, ce qui suggère une interrelation entre la régulation de l'autophagie et le remodelage de la morphologie mitochondriale [201] (figure 3.3). D'autres sources de membrane,

notamment l'appareil de Golgi, les endosomes et la membrane plasmique ont également été mises en évidence [202], suggérant que l'ensemble du réseau membranaire cellulaire peut contribuer à ce processus.

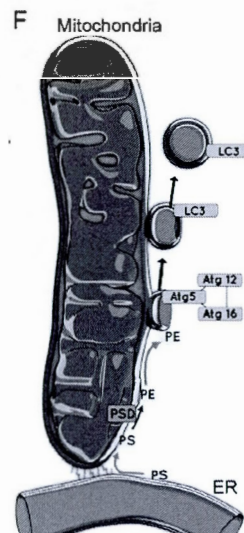


Figure 3.5 Interactions entre réticulum endoplasmique, mitochondrie et autophagosome. Tiré de Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. Hailey, Dale W. 2010

3.1.1.3 Recrutement de la machinerie autophagique

Outre l'emprunt de membrane aux organelles environnantes, l'activation de l'autophagie met également en jeu le recrutement de plusieurs protéines ATG qui vont s'assembler en complexes au niveau du PAS afin de permettre sa formation, ainsi que l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. Dans les cellules

eucaryotes, ces ATG appartiennent à deux systèmes de conjugaison semblables à celui de l'ubiquitine (Atg5,12,10 et Atg4,3,7) qui collectivement vont mener à l'assemblage d'un complexe moléculaire sur la protéine d'échafaudage Atg16L, et à l'insertion de LC3 dans la membrane du PAS via un processus de lipidation [203, 204]. Bien que beaucoup moins bien connue, il semble aussi y exister une voie d'activation de l'autophagie indépendante d'ATG16L-LC3 et menant à la formation d'autophagosomes à partir d'endosomes tardifs [202]. Cependant cette voie est encore relativement peu connue.

Comme le montre la figure 3.1, le recrutement de la machinerie autophagique au PAS est régulé par des voies de signalisation complexes. Une des mieux caractérisées à ce jour est la voie de signalisation impliquant mTOR (Mamalian Target of Rapamycin), une kinase centrale dans le couplage entre l'état énergétique cellulaire et la balance anabolisme/catabolisme. mTOR est présent dans la cellule sous forme de deux complexes protéiques distincts : mTORC1, sensible à la rapamycine et impliqué dans la régulation de l'autophagie, et mTORC2, insensible à la rapamycine et probablement impliqué dans la régulation d'autres processus cellulaires [205]. En condition d'abondance en nutriment, l'activation de mTORC1 par de nombreux signaux métaboliques, incluant les voies signalétiques couplées aux facteurs de croissance et au statut énergétique cellulaire, mène à une inhibition de l'autophagie [206]. À l'inverse, en situation de déficit nutritionnel et énergétique, l'inhibition de mTORC1 mène à l'activation de l'autophagie de concert avec d'autres voies, notamment la voie FOXO3a-NFkB qui exerce un rôle de régulateur transcriptionnel de l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie [207-209]. mTORC1 exerce son influence sur l'autophagie en régulant la formation du complexe Unc-51-like kinase 1 (ULK1), composé des homologues d'ATG1 (ULK1), d'ATG13 (mATG13), et d'ATG17 (FIP200), qui est essentiel pour lancer le processus d'initiation et

d'élongation. Plus spécifiquement, l'inactivation de mTORC1 en condition de déficit énergétique empêche la phosphorylation de mATG13, favorisant ainsi la formation de complexes ULK1-mATG13-mATG17. La voie mTOR est donc à juste titre considérée comme un régulateur central du processus autophagique.

Bien que les signaux pro-autophagiques provenant de mTORC1 soient nécessaires, ces derniers doivent être orientés dans l'espace intracellulaire afin de mener à une autophagie efficace. Cette spécification spatiale est permise par la formation de sites enrichis en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) au niveau des membranes destinées à former le PAS. La synthèse de PI(3)P est principalement assurée par la PI3-kinase de classe III VPS34 qui est recrutée au PAS naissant grâce à la formation d'un complexe avec ULK1 ainsi que BECLIN-1 (l'homologue d'ATG6), une protéine résidant normalement sous forme inactive à la surface du reticulum endoplasmique. La protéine BECLIN-1, par sa capacité à former des complexes avec VPS34 ainsi que d'autres protéines régulatrices, représente donc un important dispositif d'activation menant à l'initiation puis à l'élongation du phagophore.

3.1.1.4 Fermeture et fusion de l'autophagosome et dégradation lysosomiale

Une fois le processus de l'élongation complété, le phagophore va se fermer pour former un autophagosome via un processus de fusion des deux extrémités membranaires (figure 3.4). Au cours de ce processus, le phagophore va subir des modifications qui lui permettront, lorsque devenu autophagosome, de fusionner avec le lysosome. On retrouve notamment le clivage des protéines LC3 de la membrane externe de l'autophagosome par ATG4 [210], ainsi que la déphosphorylation du

PI(3)P par la PtdIns3P-phosphatase YMR1 qui facilite la fermeture de l'autophagosome [211].

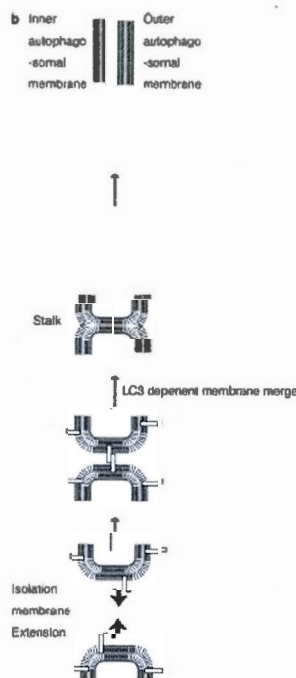


Figure 3.6 Schéma de fermeture du phagophore. Tiré de The late stages of autophagy : how does it begin. Cell death and differentiation. T, Noda . 2009.

La fixation d'adaptateurs à la membrane est également un processus important qui permettra éventuellement la fusion avec le lysosome. La protéine TECPR1 (*tectonin beta-propeller repeat containing*), qui est retrouvée au niveau des autophagolysosomes, joue notamment ce rôle, en plus de favoriser l'élongation en permettant l'interaction entre ATG5-ATG12 et le PI(3)P présent dans les membranes [212]. La protéine RAB7 est un autre adaptateur crucial impliqué dans la fusion avec

le lysosome. Ce processus nécessite entre autre RIPL, une protéine effectrice de RAB7, permet plus spécifiquement la formation de tubules joignant l'autophagosome au lysosome [213], ainsi que FYCO1 un autre effecteur de RAB7 responsable du transfert de l'auto-phagosome vers le lysosome le long des microtubules [150]. Le complexe HOPS (*homotypic fusion and protein sorting (HOPS)-tethering complex*) [214], également un effecteur de RAB7, est essentiel à la fusion grâce à son interaction avec SYNTAXIN17, un protéine de type SNARE impliquée dans les interactions membrane-membrane [215].

LAMP1 et LAMP2 (*Lysosomal-associated membrane proteins*) sont également essentielles au processus de fusion, elles agissent comme des adaptateurs à l'interface du lysosome et de l'auto-phagosome [216]. Leur ablation entraîne une accumulation d'auto-phagosomes [217]. LAMP2 en particulier semble essentielle, les souris LAMP1 KO présentent un faible phénotype tandis que les LAMP2 KO une accumulation majeure d'auto-phagosomes.

Une fois le processus de fusion complété, le cargo présent dans l'autophagosome est rapidement dégradé sous l'action des nombreuses hydrolases et protéases lysosomiales ainsi que du pH acide retrouvé au sein de ces organelles (pH 3,8 à 5,0).

3.1.2 Répresseurs endogènes de l'autophagie

De manière à empêcher une activation permanente de l'autophagie qui serait néfaste, plusieurs mécanismes d'inhibition endogènes, dont certains sont encore très peu caractérisés, agissent afin de limiter la formation du PAS.

3.1.2.1 Séquestration de BECLIN-1 au reticulum endoplasmique

Un mécanisme d'importance et qui est pertinent dans le contexte de ce mémoire est la séquestration de BECLIN-1 à la surface du réticulum endoplasmique de manière à l'empêcher de former des complexes tels que ULK1-VSP34-BECLIN1. Un mode de séquestration de BECLIN-1 décrit récemment, implique la liaison avec les protéines de la famille BCL-2, telles BCL-2 et BCL-X_L [218, 219], qui sont par ailleurs bien connues pour leur rôle anti-apoptotique au niveau des membranes mitochondriales [220, 221]. BCL-2 en liant BECLIN-1 à la membrane du réticulum endoplasmique inhibe l'autophagie en condition d'abondance en nutriments [222]. À l'inverse, cet effet inhibiteur peut être renversé en présence d'un déficit énergétique, ou en réponse à différents stress cellulaires [223]. BCL-2 de manière intéressante, se situe donc à la croisée des chemins entre l'apoptose et l'autophagie, suggérant que cette étape constitue un important point de contrôle orientant la cellule vers la réparation ou la mort en fonction de la sévérité du stress.

Récemment, il a été montré que l'interaction entre BCL2 et BECLIN-1 à la surface du reticulum endoplasmique requiert la protéine NAF-1 (*nutrient-activated*

autophagy factor-1). De ce fait, l'ablation partielle de NAF-1 par SiRNA *in vitro* empêche la liaison adéquate de BCL-2 à BECLIN-1, stimulant ainsi l'autophagie [224]. De même, la protéine BIK, un membre pro-apoptotique de la famille BCL-2, est capable de déloger NAF-1 de BECLIN-1, résultant également en une stimulation de l'autophagie [225, 226]. Il est également pertinent de mentionner que NAF-1 tout comme BCL-2 semble interagir avec les canaux calciques IP3 sur le reticulum endoplasmique [227] et que son ablation résulte en une incapacité de BCL-2 de réguler normalement les flux de Ca^{2+} sortant du reticulum, entraînant ainsi une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intra-reticulaire [228]. Il n'est cependant pas prouvé que le Ca^{2+} soit important dans la régulation qu'exerce NAF-1 sur l'autophagie.

De manière intéressante, le groupe de Shore a démontré que l'ablation génétique de NAF-1 au niveau des cellules germinales n'induit pas de phénotype spectaculaire chez la souris, sauf au niveau des muscles squelettiques où son absence induit une atrophie, une transition vers un phénotype lent-oxydatif et un excès d'autophagie [228]. Le modèle de souris NAF-1^{-/-} représente donc un modèle dans lequel un excès intrinsèque d'autophagie survient au niveau du muscle squelettique. Tel que détaillé à la section IX-A-1-b, cette caractéristique a été employée dans le présent mémoire pour tenter de stimuler l'autophagie dans le muscle de la souris *mdx*.

3.1.2.2 Autres mécanismes de répression endogène

Outre la séquestration de BECLIN-1, qui est d'un intérêt particulier pour ce mémoire, plusieurs autres mécanismes de répression endogène de l'autophagie ont été

identifiés. Sans entrer dans les détails, ces mécanismes peuvent intervenir à plusieurs étapes du processus autophagique incluant l'induction, la formation du PAS, l'élongation ainsi que la maturation en autophagolysosome (Figure 3.5). Tel que mentionné précédemment, mTOR est un répresseur puissant qui inhibe l'autophagie au niveau de l'étape d'induction. De plus, la déphosphorylation du PI(3)P par la phosphatase JUMPY [229] contribue, tout comme BCL-2 et NAF-1, à limiter la formation du PAS. La protéine FLIP [230] quant à elle, a été décrite pour sa capacité à limiter la lipidation de LC3 médiée par ATG-3, freinant ainsi le processus d'élongation (Figure 3.2). Par ailleurs, des études ont mis en évidence que l'élongation pouvait également être inhibée par la protéase calcium-sensible CALPAINE [231] qui en clivant ATG-5, limite l'assemblage du système de conjugaison ATG5-ATG12-ATG10 (Figure 3.5).

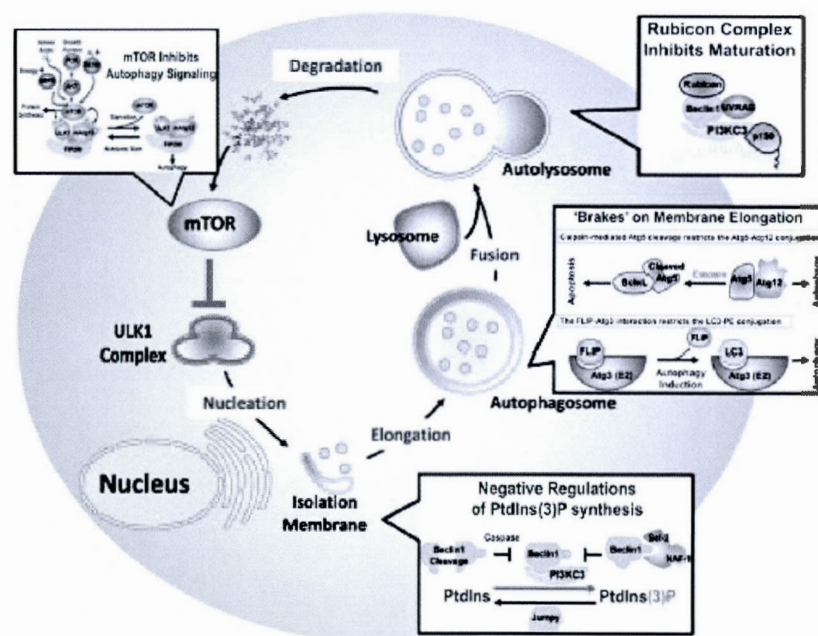


Figure 3.7 Les inhibiteurs de l'autophagie. Tiré de Negative regulation of autophagy. Cell Death & Differentiation, 2010. Liang, C.

3.1.3 Influence du calcium sur l'auto-phagosome

Finalement, et bien que la littérature soit très divergente sur ce sujet, le Ca^{2+} semble être un important régulateur de l'autophagie comme en témoigne le tableau 3.1.

Tableau 3.3 Littérature divergente sur la question de la régulation de l'autophagie par le calcium. Tiré de A dual role for Ca^{2+} in autophagy regulation. Cell Calcium. Decuyperre Jean-Paul.2011.

Publication	Year	Autophagy stimulated by	Mechanism	Downstream
Ca^{2+} as inhibitor				
Sarkar et al.	2005	Li^+ IMPase inhibitor (L690,330)	Inhibited IMPase Reduced $[\text{IP}_3]$	Not mTOR
Criollo et al.	2007	Li^+ IMPase inhibitor (L690,330) $\text{siIP}_3\text{R1/3}$ XcB	Inhibited IP_3R Inhibited by ER-targeted Bcl-2 No effect on ER $[\text{Ca}^{2+}]$	Atg5, 10 and 12 Beclin 1 Vps34
Williams et al.	2008	L-type Ca^{2+} channel inhibitors Calpain inhibitors Gsx inhibitor Adenylyl cyclase inhibitor	Decreased Ca^{2+} influx Reduced calpain activity Reduced $[\text{cAMP}]$ Reduced $[\text{IP}_3]$	Calpain cAMP
Vicencio et al.	2009	XcB	Dissociation IP_3R -Bcl-2-Beclin 1 No effect on Ca^{2+} release	Beclin 1
Khan and Joseph	2010	DT40 TKO cells	Abolished IP_3R Ca^{2+} release	mTOR Not AMPK or Akt Not Beclin 1-Bcl-2
Cárdenas et al.	2010	DT40 TKO cells	Abolished IP_3R Ca^{2+} release Reduced mitochondrial energetics	ATP production AMPK Not mTOR
Harr et al.	2010	Dexamethasone Src inhibitor siPyn	Downregulation of Pyn Reduced IP_3R phosphorylation Reduced IP_3 -mediated Ca^{2+} release	
Ca^{2+} as activator				
Buylaert et al.	2006	Hypericin-PDT	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	CaMKK β
Høyer-Hansen et al.	2007	VII D3 compounds Thapsigargin Ionomycin ATP	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ Inhibited by ER-targeted Bcl-2	AMPK mTOR Beclin 1 and Atg7
Sakaki et al.	2007	Thapsigargin	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	PKC α
Brady et al.	2007	Nutrient deprivation	Dependent on cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ Inhibited by ER-targeted Bcl-2	
Lam et al.	2008	Differentiation factor Thapsigargin	IP_3R -mediated Ca^{2+} release	Atg1 Calcineurin
Gao et al.	2008	Calcium phosphate precipitates	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	Beclin 1 and Atg5
Wang et al.	2008	Cadmium	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ IP_3R -mediated Ca^{2+} release	ERK
Grotenmeier et al.	2010	Thapsigargin	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	Not AMPK
Knöferle et al.	2010	Axonal degeneration	Increased Ca^{2+} influx Increased intra-axonal $[\text{Ca}^{2+}]$	
Law et al.	2010	Alisol B	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	CaMKK β AMPK mTOR
Vinagreux et al.	2010	Resveratrol	Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	CaMKK β AMPK mTOR
Castaldello et al.	2010	PK11195 + ATP or VII D3	Inhibition of ER-targeted Bcl-2 Increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$	

Plusieurs mécanismes et surtout différentes conditions physiologiques influencent le rôle du calcium sur l'autophagie. En effet, on peut trouver dans la littérature des évidences de son rôle activateur tout comme de son rôle répresseur de l'autophagie. Nous nous concentrerons ici sur les évidences montrant le rôle potentiel d'une dérégulation du Ca^{2+} sur l'autophagie.

3.1.3.1 Conséquence de l'augmentation du calcium intracellulaire

Dans un premier temps, le canal calcique TRPML3 présent dans de nombreux compartiments cellulaires, est recruté de façon spécifique à l'auto-phagosome en formation [232]. De plus son inhibition par des shRNAs diminue de façon drastique la formation d'auto-phagosome dans différentes conditions de stress dont la privation nutritionnelle. Son mode d'interaction à l'autophagie, bien que peu défini, semble passer par le complexe précédemment décrit ATG16L en fournissant aux abords du complexe le Ca^{2+} nécessaire à la formation de la double membrane [233]. De même, une faible augmentation du calcium intracellulaire permettrait l'activation de la $\text{CaMKK}\beta$ (Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Kinase, Kinase β), une kinase dépendante du Ca^{2+} ayant un rôle dans l'activation de l'AMPK [234, 235] mais également dans l'inhibition de mTOR [236]. Cette activation de l'AMPK en parallèle de l'inhibition de mTOR permet de stimuler l'autophagie comme le montre l'augmentation de la formation d'auto-phagosomes [237]. L' IP_3R (Inositol 1,4,5-triphosphate receptor) est un récepteur à l' IP_3 qui régule la relâche calcique du réticulum endoplasmique sous le contrôle de l' IP_3 mais également du calcium. Cette régulation calcique permet d'activer l' IP_3R sous les 300nM de calcium cytosolique mais l'inhibe au delà [238]. L' IP_3R activé joue un rôle inhibiteur sur l'autophagie [239] et son inhibition pharmacologique ou génétique entraîne une augmentation de la formation d'auto-

phagosomes. Toutefois les mécanismes de cette inhibition ne sont pas encore totalement clarifiés, reste que la fonction de canal calcique soit essentielle dans ce phénomène [240]. En somme une augmentation du calcium cytosolique supérieur à 300nM entraine l'inhibition de l'IP₃R et lève donc l'inhibition de l'autophagie [238]. Une augmentation localisée du calcium au niveau du cargo, ou cytosolique supérieur à 300 nM permet donc de stimuler l'autophagie. Les pics aberrants de calcium enregistrés au niveau du muscle dystrophique seraient donc suffisants pour initier l'autophagie, toutefois les observations reliées à l'autophagie dans un contexte de DMD diffèrent, ce qui laisse penser que l'augmentation du calcium est un médiateur potentiel de l'autophagie dépendamment de l'environnement.

3.1.3.2 Conséquence de la diminution du calcium intracellulaire

La protéine BCL-2 dont le rôle dans l'autophagie a précédemment été décrit, joue également un rôle dans la régulation calcique cellulaire. Lorsque présente au réticulum endoplasmique, BCL-2 augmente la concentration de calcium réticulaire diminuant ainsi la concentration cytosolique permettant l'inhibition de l'autophagie [237].

Malgré une littérature riche en oppositions sur le sujet, les preuves que le Ca²⁺ puisse jouer un rôle dans l'activation de l'autophagie sont fortes et en adéquation avec de nombreux mécanismes observés et force est de constater qu'il existe un mécanisme d'initiation de l'autophagie dirigé par les variations de calcium cytosolique.

L'autophagie est un mécanisme cellulaire essentiel et complexe qui permet de dégrader les protéines à longues demi-vies, mais également d'éliminer les protéines et organelles endommagées, les produits exogènes tels les bactéries et virus. Ce mécanisme latent peut également être stimulé par les variations de l'environnement calcique, l'augmentation du stress oxydant et la diminution des ressources nutritives. Les variations de ce mécanisme, c'est à dire son hyper-activation ou son inhibition, entraînent des changements métaboliques menant généralement à des pathologies graves. On observe également dans d'autres pathologies telles que la DMD, une modification du profil autophagiques, qui peuvent entraîner une aggravation du phénotype. De nombreuses pathologies, dont la DMD, présentent des variations de ce système essentiel et il sera développé dans la partie suivante les implications de l'autophagie dans des pathologies musculaires.

3.2 Autophagie et pathologies musculaire

La DMD est une maladie dont le principal symptôme est la perte de masse musculaire, cette nécrose progressive est alternée de phases de régénération mais génère de nombreux dommages que les cellules doivent traiter. L'autophagie est donc le système cellulaire le plus à même de prendre en charge ces dommages. Toutefois des phénomènes autophagiques dans ce contexte pathologique sont encore peu connus, bien que plusieurs études s'y soient intéressées [4, 14, 15, 241]. L'augmentation des dommages et la diminution de leur traitement par l'organisme peut être une cause de la dégénération rapide des muscles chez les patients DMD, et bien que ce phénomène soit de plus en plus étudié, la relation entre l'autophagie et la DMD reste à être élucidée. Toutefois de nombreuses maladies impliquant une dérégulation de l'autophagie, ou causées par une altération de cette fonction majeure

peuvent apporter des éléments de réponses quant aux conséquences des variations de l'autophagie (figure 3.6).

Nous établirons dans cette partie les conséquences de la variation de l'autophagie dans un contexte musculaire, au travers de plusieurs pathologies pertinentes et en extrapolant les résultats pour les appliquer aux premières observations menées dans la DMD, dans l'optique de trouver un angle d'approche dans la guérison de la pathologie ou, au moins, l'amélioration des conditions de vie des patients.

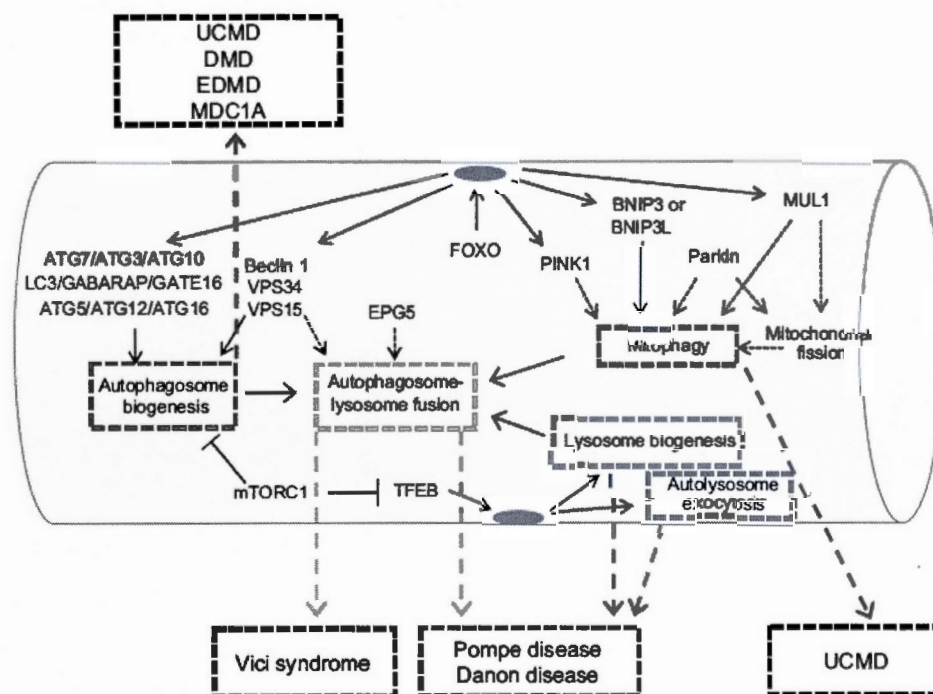


Figure 3.8 Visualisation des pathologies liées aux variations de l'autophagie. Tiré de Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. Cell Biology and Disease.

Sandri. M. 2013

3.2.1 Conséquences pathologiques d'un déficit d'autophagie

De nombreuses pathologies dont les causes sont la dérégulation d'effecteurs principaux de l'autophagie se caractérisent par une myopathie plus ou moins sévère, touchant les muscles striés squelettiques et le cœur [188, 216, 242-245]. L'investigation du rôle de l'autophagie dans la pathogenèse de la DMD est très jeune et doit s'appuyer sur d'autres modèles dont les symptômes se rapprochent du cas de la DMD. L'analyse des maladies touchant des étapes précises de l'autophagie peut permettre de remonter à la source des troubles constatés chez les patients de la DMD.

La maladie de Pompe a été découverte en 1932 sur trois patients différents, atteints de faiblesse musculaire et dont l'autopsie a révélé une présence anormale de glycogène [242]. Trente ans plus tard, il est établi que l'absence de l'acide α -glucosidase (AAG) est la cause de cette accumulation de glycogène et la source de la déstabilisation drastique des fibres musculaires [246]. Cette enzyme du lysosome a pour fonction de cliver le glycogène en glucose, mais en son absence, le glycogène s'accumule dans le lysosome empêchant toute autre dégradation de cargos. Les premières hypothèses de recherche se sont tournées vers l'autophagie [246] grâce au lien qui venait d'être établi entre le lysosome et ce mécanisme [184, 247], et l'observation de corps denses et de structures à doubles membranes chez les patients atteints des formes précoces et tardives [248]. De plus l'autophagie est un mécanisme d'intégration du glycogène au lysosome [249]. Toutefois, ce n'est pas le seul mécanisme, puisque l'inhibition de l'autophagie ne permet pas de rétablir un phénotype musculaire normal, mais juste de réduire la taille des lysosomes et corps denses dans les muscles [250].

Concernant la maladie de Danon, la dérégulation de l'autophagie provient de l'ablation du gène *Lamp2*, codant pour une protéine servant d'adaptateur entre l'auto-phagosome et le lysosome [216]. L'absence de cette protéine empêche la fusion des deux compartiments et entraîne l'accumulation d'auto-phagosomes. Dans le souris *LAMP2* KO, la déstructuration des fibres musculaires du fait de l'accumulation de vacuoles autophagiques entraîne une perte de la force musculaire [216]. Malgré les origines différentes de ces maladies, force est de constater qu'un blocage de l'autophagie à des stades tardifs de la maturation de l'auto-phagosome entraîne un phénotype musculaire myopathique important.

Le syndrome de Vici se présente sous la forme d'une défaillance systémique multiple. Au niveau du muscle squelettique, on observe une accumulation de corps denses et de mitochondries anormales [243]. Les dysfonctions associées à cette maladie ont pour cause l'ablation du gène *EPG5* [251], un gène hautement conservé qui joue un rôle dans l'initiation de l'autophagie en condition de privation nutritionnelle. Cette ablation a pour conséquence une diminution du flux autophagique observable par l'accumulation de marqueurs tel p62 et LC3-II tant chez l'Homme [243] que dans des modèles de souris *Epg5*-KO [252, 253].

D'autres défauts du système autophagique ont pu être étudiés grâce à la génération de souris génétiquement modifiées pour des gènes spécifiques responsables d'étapes cruciales de l'autophagie. C'est le cas des souris *Atg5* [188], *Atg7* [254] et *VPS15* KO [245].

Le rôle d'*ATG5* a précédemment été discuté au chapitre des voies moléculaires de l'autophagie, notamment pour son importance dans la lipidation de LC3 [188]. L'ablation de ce gène, comme dans les pathologies de Pompe ou de Danon, entraîne une accumulation de structures à doubles membranes anormales et mène à la mort cellulaire [255].

Le modèle de souris *ATG7* [254] présente un phénotype musculaire comparable, même si la perte de force et de fonctions sont moins sévères que dans les modèles précédemment cités. Toutefois, on ne constate pas de déstructuration du muscle qui engendrerait la déstabilisation des fonctions cellulaires, mais principalement une atrophie sévère de la taille des fibres de l'ordre de 30 à 40%.

Il est important de noter que le système autophagique présente toutefois une redondance lui permettant, dans le cas d'ablation d'un effecteur majeur, d'assurer à la cellule un « service minimum ». Ce point important est souligné par la découverte de systèmes autophagiques compensatoires indépendants d'*ATG5* et d'*ATG7* [256]. En effet, il reste possible d'activer l'autophagie dans des modèles cellulaires où *ATG5* ou *ATG7* sont absents. Cette activation passe par d'autres effecteurs dont les kinases *ULK1* et la *PI3K* ainsi que *RAB9* (voir chapitre sur les voies moléculaires). Toutefois le système canonique de lipidation du LC3, *ATG5/ATG12* reste essentiel au développement normal de l'auto-phagosome [257].

Les souris présentant une ablation de *VPS15*, montrent également les signes de myopathies rencontrés dans les maladies lysosomiales [245]. *VPS15* est un adaptateur stabilisant le complexe Beclin-1/*VPS34*, et joue un rôle dans le contrôle de

mTOR [258]. Dans ce modèle, bien que la formation de l'auto-phagosome ne soit pas modifiée, le flux autophagique est fortement diminué, entraînant de ce fait, une accumulation de vacuoles autophagiques qui déstabilisent la structure du muscle. Cette modification de structure se rapproche des maladies de Pompe, Danon et des modèles d'inhibition de l'autophagie ATG5 et ATG7 KO.

L'inhibition de l'autophagie entraîne un phénotype musculaire myopathique, où, l'accumulation de vacuoles autophagiques déstabilise le muscle ou entraîne une sévère atrophie. La restauration des paramètres autophagiques dans ces modèles ne permet pas toujours de rétablir le phénotype musculaire, particulièrement dans la maladie de Pompe [250]. Une telle inhibition dans un contexte dystrophique pourrait aggraver le phénotype musculaire.

On observe dans des modèles de dystrophie musculaire comme l'Emery-Dreyfus (EDMD) une altération de la fonction autophagique à des stades d'initiation dans le muscle. L'EDMD est comme la DMD, une maladie génétique liée au chromosome X, et peut avoir comme source une mutation de l'Emerin ou de la LaminA/C. Les conséquences de ces mutations sont multiples, mais au niveau musculaire elles se caractérisent par une diminution de la masse et des fonctions. Dans le cadre d'une délétion de la LaminA/C, on observe une activité importante de la voie AKT [259] menant à l'activation de mTOR [260] et une diminution du flux autophagique, tel qu'indiqué par l'accumulation de haut niveaux de p62, de LC3 ou d'ATG7[260]. De plus chez des souris présentant une délétion de la Lamin A/C ou présentant une modification du gène la rendant non-fonctionnelle, l'inhibition de mTOR par la rapamycine afin de stimuler l'autophagie permet d'améliorer le phénotype musculaire.

C'est également le cas dans les dystrophies musculaires congénitales d'Ulrich (UCMD) ou de Bethlem (BM) [261], mais également chez les souris Col6^{-/-}, un modèle de myopathie lié à la déficience en collagène de type IV. Ces défauts sont constatés au niveau de plusieurs marqueurs typiques admis [262] tels que le ratio LC3II/LC3 I basal ou lors du blocage de la fusion auto-phagosome/lysosome qui détermine le flux autophagique. Également la quantité de SQSTM1/p62 qui augmente lors de l'inhibition de l'autophagie, les quantités de BECLIN1 et BNIP3, respectivement impliquées dans les processus d'autophagie et de mitophagie, sont également diminuées. Enfin, l'étude en microscopie électronique révèle une augmentation du nombre de vésicules autophagiques dans les myofibres [261].

Les travaux successifs sur le modèle de souris Col6^{-/-} afin d'élucider des mécanismes d'amélioration du phénotype notamment par l'exercice [263] mais aussi par la privation en nutriments [261], deux méthodes connues pour augmenter l'autophagie, ont permis de montrer que la stimulation de l'autophagie permet d'améliorer le phénotype musculaire.

Ces conclusions intéressantes concernant les myopathies d'Ulrich et de Bethlem présentent le potentiel d'être applicable à d'autres myopathies et en particulier la DMD.

De plus, une étude se basant sur le traitement à la rapamycine, pour ses vertus immunosuppressives comme la prednisone, montre une amélioration du phénotype *mdx* dans le diaphragme mais pas dans le *tibialis anterior* (TA) [264]. Or l'inhibition de mTOR est une des voies d'activation de l'autophagie comme précédemment décrit. C'est ainsi que les travaux de De Palma [15] et Pauly [4] ont permis de mettre en évidence que l'activation de l'autophagie chez la souris *mdx* permet d'améliorer le phénotype musculaire.

Dans un premier temps De Palma [15] constate qu'en plus d'une désorganisation de la structure musculaire, l'autophagie est altérée dans le diaphragme ainsi que dans le TA. L'expression des gènes liés à l'autophagie est radicalement modifiée, et la branche inhibitrice (pAKT, pS6) est fortement stimulée. De plus, il observe une diminution de la présence de LC3II et une accumulation de p62 témoin de l'inhibition de l'autophagie [262]. On constate également un défaut du flux autophagique, c'est-à-dire, la formation d'auto-phagosomes en réponse au blocage de la fusion des auto-phagosomes par la chloroquine, ou stimulé par le jeûne. Chez l'Homme, le même défaut est constaté par le plus faible ratio LC3II/LC3I, l'accumulation de p62 et la stimulation de la voie Akt. (Figure 3.7).

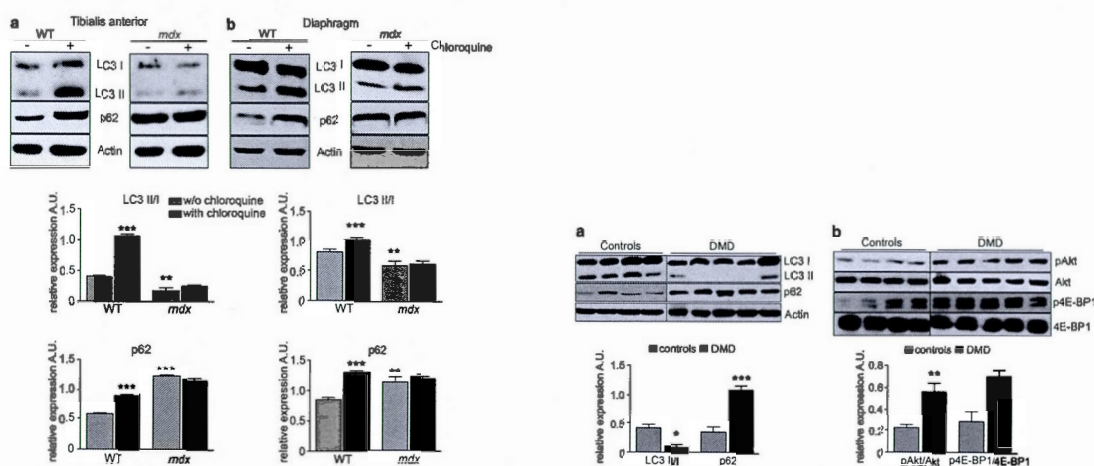


Figure 3.9 Observation de l'altération de l'autophagie chez les souris mdx et chez des patients DMD. Tiré de Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. Cell Death and Disease. De Palma C. 2012

Dans un deuxième temps, le traitement de ces souris avec un régime faible en protéine (LPD) permet de stimuler l'autophagie et de restaurer un profil d'expression des gènes de l'autophagie. De plus, le phénotype musculaire s'améliore, les zones de nécrose musculaire diminuent tout comme les zones apoptotiques.

Les travaux de Pauly [4], se basent sur une approche plus pharmacologique, dans le but de palier aux défauts énergétiques et métaboliques constatés chez les souris *mdx*. AMPK est un senseur de l'état énergétique de la cellule et un effecteur de l'autophagie lorsqu'il est phosphorylé (pAMPK). Chez la souris *mdx* on observe une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, mais également de certains effecteurs de l'autophagie. Il n'est pas observé de défaut de l'autophagie comme suggéré par les travaux de De Palma. Toutefois, les méthodes d'investigations plus limitées concernant l'autophagie basale ne permettent pas de conclure à une réelle divergence avec les précédents travaux. Quand bien même un défaut de l'autophagie basal n'a pu être prouvé ici, au vu des dommages cellulaires massifs rencontrés dans la pathologie de la DMD, la stimulation de l'autophagie relativement basse par rapport aux dommages, peut être bénéfique.

Les défauts métaboliques constatés, ainsi que la déstructuration musculaire viennent faire échos aux résultats connus sur la DMD chez la souris ou l'Homme.

La stimulation de la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR permet d'observer une amélioration des fonctions musculaires au niveau du diaphragme, et de la structure musculaire en générale. Ces améliorations passent certainement par la stimulation de l'autophagie mais peut-être également, par la stimulation du métabolisme énergétique

et de la biogenèse en réponse à l'AICAR ou à l'entraînement, comme le suggèrent de récentes études [122, 265, 266]. Ces études démontrent l'activation de l'Acetyl CoA carboxylase (ACC) [4, 265, 266], la surexpression de PGC1 α [122, 266], et l'augmentation de l'activité de la COX [266], mais également l'augmentation du potentiel membranaire mitochondrial [122].

De nombreuses myopathies ont pour causes des défauts du système autophagique entraînant l'accumulation de vacuoles dans les fibres, menant à la déstructuration totale des muscles, ainsi qu'à leur perte de fonctions et de masse. Les maladies lysosomiales ainsi que les modèles d'inhibitions de l'autophagie ont permis de déterminer l'importance de l'autophagie dans le maintien des fonctions musculaires, et les récents travaux sur la stimulation de l'autophagie dans des contextes myopathiques ouvrent une porte thérapeutique pour le traitement des patients atteints de la DMD.

3.2.2 Conséquences pathologiques d'un excès d'autophagie

Il a pu être observé qu'une inhibition de l'autophagie entraînait un phénotype myopathique sévère or c'est également le cas lorsque l'autophagie est stimulée.

C'est notamment le cas pour la MDC1A (Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive), une maladie génétique présentant une déficience de la LAMININE- α -2, anciennement MEROSINE [267]. D'une façon intéressante, la LAMININE- α -2 se trouve à l'opposé de la dystrophine et joue également un rôle

structurant pour la fibre musculaire ainsi qu'un rôle transducteur. Les symptômes de cette maladie sont une faiblesse musculaire profonde, des troubles articulaires ainsi que des troubles de la colonne vertébrale. Dépendamment de la gravité de la mutation des troubles respiratoires. La cause principale de décès est l'infection de tractus respiratoire au environ de la première décennie du patient. La génération de modèles murins de cette pathologie [268] ont permis d'établir qu'une cause majeure de la pathologie et de la faiblesse musculaire résidait dans l'activation disproportionnée de l'autophagie [269] et que son inhibition permettait de rétablir un phénotype musculaire normal.

D'autres modèles murins ont également permis d'établir un lien entre la stimulation excessive de l'autophagie et des troubles musculaires. C'est le cas des souris RUNX-1 KO [270]. RUNX-1 est une protéine interagissant avec l'ADN qui est surexprimée dans le cas de dénervation musculaire, ce qui permet de maintenir l'organisation des myofibrilles, mais également d'inhiber l'autophagie. Il a été démontré que l'ablation de cette protéine, entraîne une augmentation de l'autophagie et une atrophie musculaire prononcée [270].

Le second syndrome de Wolfram est une maladie génétique se caractérisant par la modification du gène CISD2, qui code pour la protéine NAF-1. Chez l'Homme, les symptômes majeurs sont l'apparition d'un diabète *melitus* ou insipide, mais également une dégénérescence des tissus musculaires. Dans le modèle murin, l'observation en microscopie électronique des muscles, révèle une importante déstructuration des muscles avec accumulations de mitochondries anormales. L'ablation de NAF-1 permet une activation substantielle de l'autophagie (Figure 3.8).

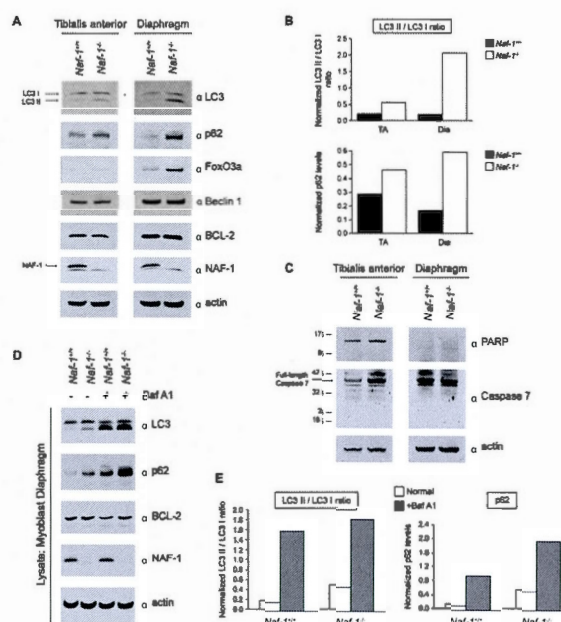


Figure 3.10 Évidence de l'augmentation de l'autophagie dans un modèle murin de l'ablation de NAF-1. Tiré de Bcl-2-associated autophagy regulator Naf-1 required for maintenance of skeletal muscle. Human molecular genetics.

Chang N.C. 2012

Si l'excès d'autophagie présente une évidente relation avec des phénotypes musculaires de type myopathie, les symptômes semblent relativement moins sévères que dans les cas d'une inhibition.

En conclusion, un dérèglement du système autophagique entraîne irrémédiablement des conséquences négatives sur le muscle, et la correction de ce dérèglement permet de restaurer un phénotype musculaire normal.

3.3 La mitophagie

L'autophagie est, selon la précédente description, un mécanisme de dégradation générale des dommages cellulaires, des protéines à longue demi-vie, et des organelles endommagées. Il a été discuté du rôle, dans la pathogenèse de la DMD, des dysfonctions mitochondriales mais également établi un défaut du système autophagique. La mitophagie se trouve à l'interface de ces deux mécanismes. Nous discuterons dans ce paragraphe, dans un premier temps, des mécanismes impliqués dans la spécificité de la dégradation des mitochondries puis, des conséquences pathologiques potentielles de son dérèglement.

Ce système spécifique est premièrement décrit [16] suite aux travaux originaux menés sur les levures [271] où, il a été démontré que la dégradation des mitochondries passe par un mécanisme spécifique qu'il est possible d'inhiber.

L'étude de la dégradation des mitochondries chez la levure, a permis de lever le voile de la spécificité et du ciblage [272-274] de ces organelles dans le processus de dégradation. En effet, la variation du milieu nutritif, entraînant une transition des systèmes métaboliques, fait générer à la mitochondrie de haut taux de radicaux libres, mettant ainsi en danger la survie des levures. La dégradation de ces structures est un moyen spécifique de protection, doté de ces propres moyens de régulation notamment les Atg -31/32 et 33 [275, 276].

La mécanique derrière la mitophagie chez les mammifères peut se scinder en deux voies distinctes. La première passe par le recrutement d'adaptateurs à la membrane et

le second, plus direct, met en jeu des récepteurs de l'autophagie (figure 3.9). Toutefois ces deux systèmes sont activés par une dépolarisation de la membrane mitochondriale [277].

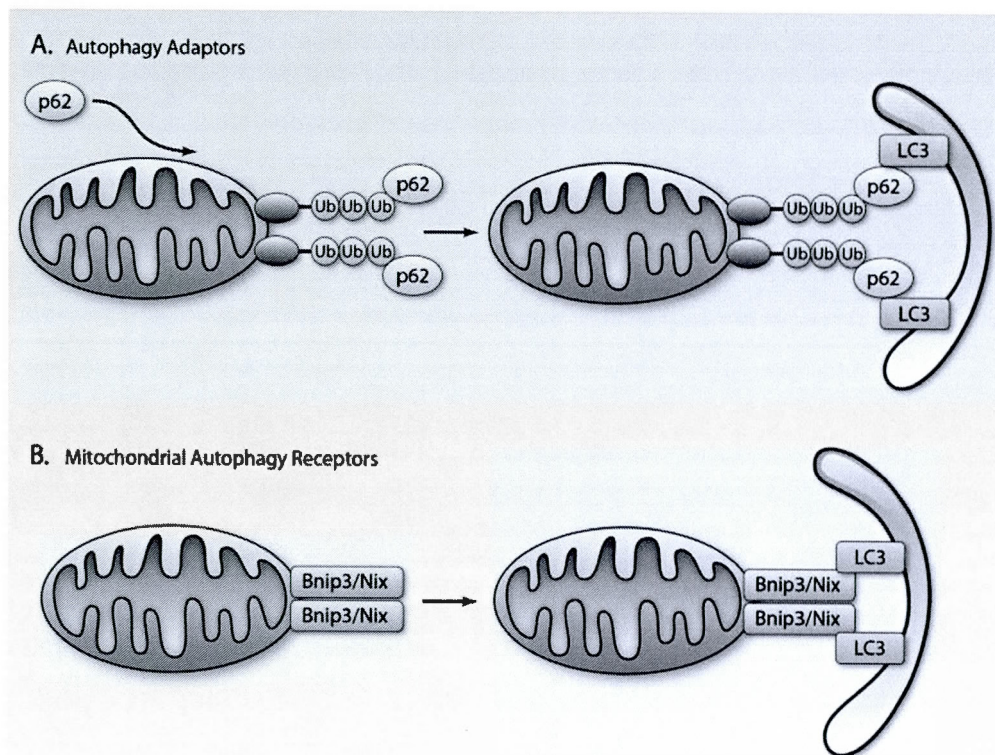


Figure 3.11 Différents types de mitophagie chez les mammifères. Tiré de [278]

L'observation de ce phénomène chez les mammifères a pu être possible grâce à la découverte d'une protéine fortement impliquée dans le contrôle qualité mitochondriale. L'inhibition malencontreuse du complexe I de l'ETC, due à l'injection d'une drogue analogue à la Meperidine, a entraîné un syndrome de type

parkinsonien chez 4 patients [279], des observations similaires ont également été faites dans des modèle d'ablation de *Park2* [280-282], ce qui a permis d'établir le lien entre mitochondrie et PARKIN. PARKIN, une E3-ligase codée par le gène *Park2*, et dont l'ablation chez l'Homme entraîne la maladie de parkinson a donc été étudiée pour finalement apporter les preuves d'un tel mécanisme chez les mammifères [283]. Il a pu être établi, dans des modèles cellulaires premièrement, que PARKIN est une protéine majoritairement cytosolique qui, en cas de dépolarisation de la membrane était recrutée à la mitochondrie en vu de sa dégradation (Figure 3.10). Afin de mieux établir ce système et de le discerner d'une autophagie globale, les mêmes essais ont été conduits dans des cellules dont l'initiation de l'autophagie était inhibée (ATG5 KO). Les résultats confirment l'existence d'un système autophagique dépendant de PARKIN et dont la cible unique est la mitochondrie. De plus, ce mécanisme peut également être stimulé par l'augmentation du stress oxydant, bien qu'il n'en soit pas dépendant.

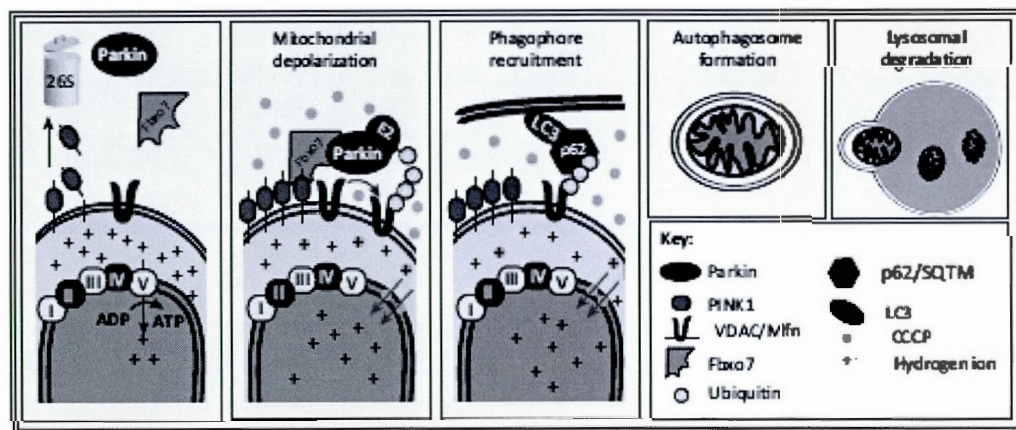


Figure 3.12 Mécanisme de sélection des mitochondries pour dégradation par le système autophagique. Tiré de [284]

Ce mécanisme a pu être enfin élucidé grâce à la découverte d'une protéine recrutant PARKIN à la membrane mitochondriale, tout d'abord chez la *Drosophile* [285-287] puis confirmé dans des modèles cellulaires [288] et des modèles murins [289, 290]. PINK-1, est une kinase mitochondriale qui phosphoryle notamment MFN-1 et 2 [291, 292] pour activer le recrutement de PARKIN à la membrane mitochondriale (figure 3.11). Une fois recrutée à la membrane externe mitochondriale, PARKIN grâce à son rôle de E3-ligase, ubiquitinera la membrane au niveau de VDAC et MFN-1/2, permettant à p62 de s'y fixer et ainsi recruter le LC3II au cargo (VIII-A) [277].

L'expression de PINK-1 n'est pas dépendante de l'expression de *Park2*, par contre, le recrutement de PARKIN à la membrane est dépendant de la présence de PINK-1 mais également de NIX, potentiellement responsable dans cette cascade moléculaire de la dépolarisation de la membrane [277].

Lors de l'ablation de PARKIN dans des myocytes murins, on observe l'accumulation de mitochondries anormales [282] mais également des dysfonctions mitochondriales aux niveaux des leucocytes [293] et des fibres musculaires (données non publiées du laboratoire). De même, l'ablation de PINK-1 entraîne, chez la souris une accumulation de larges mitochondries dans le cortex cérébral, ainsi que l'apparition de dysfonctions mitochondriales dans le striatum [290]. Ces résultats tendent à montrer que l'inhibition potentielle de la mitophagie par l'ablation de certains de ses effecteurs, entraîne l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles.

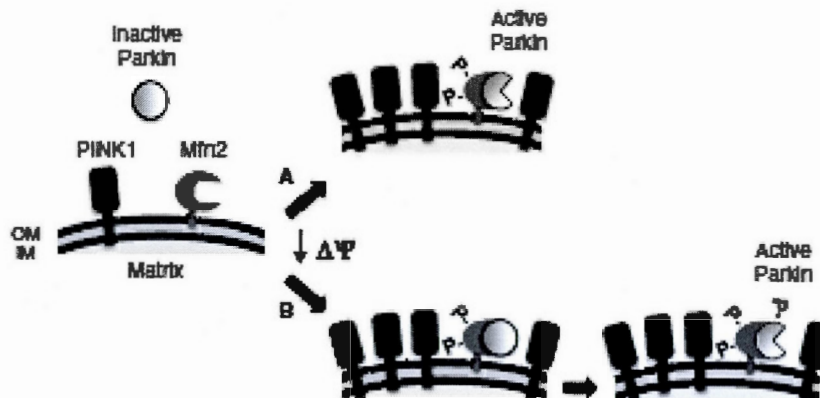


Figure 3.13 Modèle de recrutement et d'activation de PARKIN à la membrane mitochondriale. Tiré de [294]

Le second système consiste au recrutement de récepteurs directs du LC3II, sans le concours de p62, ou PINK-1 et PARKIN.

Le couple BNIP3/NIX (figure 3.5) est recruté à la membrane mitochondriale suite à la dépolarisation de la mitochondrie. BNIP3 et NIX sont des protéines contenant un motif BH3 comme BCL-2 [295, 296], et dont la partie carboxy-terminale permet l'insertion dans la membrane mitochondriale. Ces deux protéines sont sous le contrôle de HIF-1, un senseur de l'hypoxie cellulaire [297], mais aussi sous celui FOXO3, lors de privation nutritive du milieu cellulaire [298]. Lorsque la membrane mitochondriale est dépolarisée, NIX et BNIP3 y recrute LC3 et le fixe grâce au motif LIR présent dans leur séquence [299]. FUNDC1 est une protéine mitochondriale dont l'activation par l'hypoxie permet de recruter LC3II et de le fixer à la membrane grâce au même motif LIR [300].

Enfin, la CARDIOLIPIN (CL) est un phospholipide de la membrane interne mitochondriale, qui sous l'influence d'une faible dépolarisation due à l'inhibition du complexe I par exemple, se déplace à la membrane externe et initie la mitophagie fixant LC3. Le mécanisme activant le déplacement de la CL semble plus tenir de la dysfonction des complexes de la chaîne respiratoire et de l'intégrité de la mitochondrie, que de la dépolarisation elle-même [301].

La mitophagie est bien un système de dégradation spécifique de la mitochondrie, dont les effecteurs multiples assurent une redondance. Les stimuli permettant d'initier ce système sont le stress oxydant généré par l'hypoxie, le manque de nutriments et les dysfonctions mitochondriales.

Au cours de cette revue de littérature, l'importance des mitochondries dans la pathogenèse de la DMD a clairement été établie, comme a pu l'être le rôle de l'autophagie dans la dégradation des dommages liés au phénotype musculaire des patients. Si un problème de l'autophagie générale a pu être observé dans les modèles murins et humains, et au vu des dysfonctions mitochondriales observées, ainsi qu'aux hauts taux de ROS enregistrés, il est imaginable d'observer une modification de l'activation de la mitophagie également dans un contexte de DMD.

CHAPITRE IV

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Notre revue de la littérature met en évidence que dysfonctions mitochondriales et altérations de l'autophagie / mitophagie sont deux mécanismes importants dans la progression de la DMD.

Nous proposons d'étudier le rôle de l'autophagie et de la mitophagie dans la pathogenèse de la DMD au travers de la mesure des capacités fonctionnelles mitochondriale.

Pour ce faire, nous avons généré deux nouveaux modèles de souris transgéniques dans le but d'inhiber la mitophagie grâce au modèle *mdx-Park2* KO et de stimuler l'autophagie générale grâce au modèle *mdx-NAF-1*^{+/-}.

Park2 est le gène codant pour la protéine PARKIN, identifiée comme un modulateur de la mitophagie [288]. La lignée murine dont l'expression du gène est altérée a été créée par Perriquet [302], et le croisement de ces souris avec une lignée *mdx*, nous

permettra d'observer les fonctions mitochondriales dans un contexte de DMD en l'absence potentielle de mitophagie. Ces souris devraient présenter un phénotype myopathique plus prononcé, et des dysfonctions mitochondriales plus importantes.

Nous proposons donc de démontrer que la mitophagie est un mécanisme essentiel au maintien de la qualité et des fonctions mitochondriales chez la souris *mdx*.

Nutrient-deprivation autophagy factor-1 (NAF-1), est une protéine identifiée dans le contrôle de l'autophagie agissant en amont de BCL-2 au niveau du réticulum endoplasmique, afin de bloquer l'autophagie. Une lignée murine de l'ablation de l'expression de ce gène a été créée par l'équipe de Shore et présente une sur-activation de l'autophagie [228]. Toutefois, afin d'obtenir une activation modérée de l'autophagie le croisement avec des souris *mdx* se fera à l'état hétérozygote présentant une ablation partielle de l'expression du gène. Ce modèle permettra d'évaluer l'impact de l'augmentation partielle de l'autophagie sur les fonctions mitochondriales.

Les souris *mdx*- *Naf-1*^{+/-}, devraient présenter un phénotype musculaire proche de la normale, et des fonctions mitochondriales améliorées.

Nous proposons ainsi de démontrer que la stimulation partielle de l'autophagie permet de rétablir les fonctions mitochondriales chez la souris *mdx* ainsi que le phénotype musculaire.

L'étude consiste donc en l'analyse parallèle, des deux populations décrites et de leurs contrôles respectifs, selon les paramètres de capacités fonctionnelles mitochondriales et autophagiques.

Les capacités fonctionnelles mitochondriales ont été évaluées sur fibres perméabilisées de muscles squelettiques au travers de la respiration mitochondriale, de la production de peroxyde d'hydrogène et de la capacité de rétention calcique. La quantité de protéines de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs, ainsi que leurs activités enzymatiques ont été mesurées dans des homogénats de muscle.

L'autophagie basale comme les flux autophagiques ont été mesurés par la quantification de l'expression des gènes principaux des différentes étapes de l'autophagie. Le flux autophagique a été généré en réponse au jeûne et au blocage de la dégradation des auto-phagosomes à la chloroquine.

CHAPITRE V

MÉTHODES DE DÉTECTION, MESURES ET ANALYSES

5.1 Croisements des souris, gestion de colonies et genotypage

Les animaux ont été générés et manipulés en secteur exempt d'organisme pathogène spécifique (EOPS ou SPF pour « *Specific Pathogen Free* ») selon un cycle diurne nocturne 12 :12. Une diète standard ainsi que l'eau étaient fournies *ad libitum*. Les animaux mâles de 6 et 12 semaines ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

Toutes les procédures ont été validées par un comité sous les numéros de protocole #13-061 (secteur EOPS) et #13-062 (secteur conventionnel).

5.1.1 Obtention des souris

Les souris utilisées pour cette étude sont le croisement d'organismes génétiquement sélectionnés (OGS), soit les souris *mdx* et d'organismes génétiquement modifiés (OGM) soit les souris Parkin KO et Naf-1 KO.

L'obtention de lignées stables, au génotype connu et sans dérive possible nécessite de suivre des protocoles de dérivation simples.

5.1.1.1 Les souris *mdx*

Comme décrit par Bulfield en 1984, l'obtention de souris portant une mutation du chromosome X proche de la myopathie de Duchenne, se fait par dérivation successive de cinq générations. Plutôt que de les dériver au laboratoire, nous avons privilégié l'achat auprès du fournisseur d'animaux *Jackson Laboratories* (C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}J). Ces souris sont issues d'un fond congénique C57BL10J, c'est-à-dire que toutes les souris sont génétiquement identiques au C57BL10J d'origine sauf pour le locus de la dystrophine.

5.1.1.2 Les croisements *mdx-Park2* et *mdx-Naf-1*

Les souris Parkin KO (Park2) [303] ne présente pas, au niveau musculaire, d'altération structurelle mais on observe des déficits importants en termes de respiration mitochondriale, une plus grande sensibilité à l'ouverture du pore de perméabilité ainsi qu'une accumulation de dommages oxydatifs plus important que chez les contrôles (données non publiées). Ces évidences laissent supposer une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles due, peut-être, à un manque de mitophagie, sans toutefois le prouver.

Les souris Naf-1 quant à elles, présentent entre autre un flux d'autophagie augmenté [228]228].

Dans l'ensemble ces deux modèles présentent donc d'une part une potentielle diminution de la mitophagie et d'autre part une potentielle activation de l'autophagie ce qui en fait deux modèles intéressants dans le cadre de la modulation de l'autophagie.

Les croisements des deux modèles se sont faits selon les mêmes modalités.

Un premier croisement (Figure 5.1), F1 entre les souris *mdx* et des souris *Parkin*^{-/-} a donné une génération F2 de pure hétérozygotes *mdx-Parkin*^{+/-}. La génération F3 issue du croisement d'animaux de F2, est composée de trois génotypes différents à savoir, des homozygotes portant la mutation *Park2* (*mdx-Parkin*^{-/-}), des homozygotes non mutés (*mdx-Parkin*^{+/+}), et des hétérozygotes (*mdx-Parkin*^{+/-}). La génération F4 sur laquelle nous avons travaillé, est issue de croisements homozygotes, *mdx-Parkin*^{+/+} X *mdx-Parkin*^{+/+}, ou *mdx-Parkin*^{-/-} X *mdx-Parkin*^{-/-}.

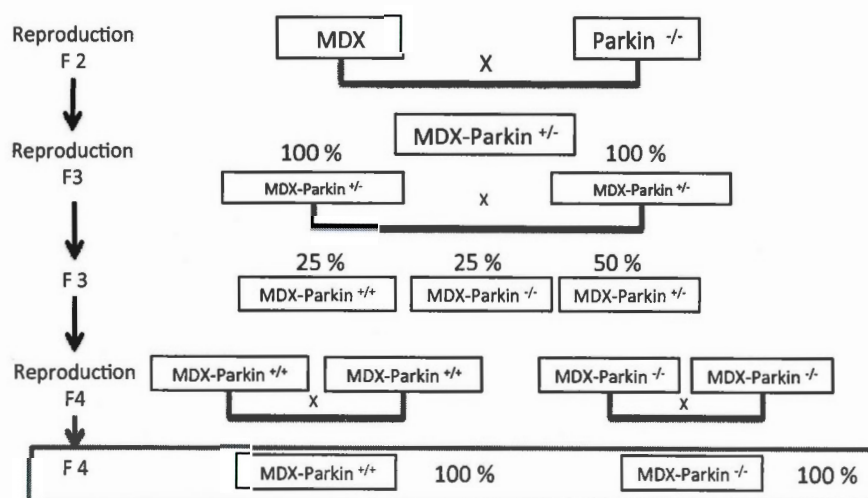


Figure 5.1 Schéma des croisements génétiques opérés pour obtenir les souris *mdx-Parkin*

5.1.2 Maintien de la colonie

Les souris *mdx* sont de bons reproducteurs, et les Parkin KO comme les Naf-1 ne sont pas connues pour avoir des problèmes de reproduction. Les paramètres ont été étudiés sur un nombre moyen de 7 à 9 animaux par groupe, ce qui est communément utilisé dans ce genre d'étude.

5.1.3 Gestion du génotype

Le génotypage a été réalisé par PCR (Polymerisation Chain Reaction), sur les générations F2 et F3. Chaque première portée de la génération F4 a été également génotypée, afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'erreur de croisement.

Pour ce faire, il a été nécessaire d'utiliser deux paires de sondes afin de vérifier la présence de l'ADN sauvage (WT), et la présence de l'ADN muté (NEO). Les séquences suivantes ont été utilisées : WT-S : TCC ACT GGC AGA GTA AAT GT ; WT-AS : TGC TCT GGG GTT CGT C-3 ; NEO-S: CGT GCT TGC CGA ATA TCA T; NEO-AS : AAG GCG ATA GAA GGC GAT G. La séquence de PCR utilisée a été la suivante : Dénaturation 95°C 8 min (1 cycle) - Dénaturation 95°C 1 min/ hybridation 58°C 1 min/ élongation 72°C 1 min (35 cycles)- stabilisation 72° 5 min (1 cycle).

5.2 Respiration, production de radicaux libres et capacité de rétention calcique sur fibres perméabilisées

Une des expérimentations fondamentales de cette étude a été la mesure de la fonction mitochondriale. Grâce à trois paramètres essentiels que sont la respiration, la production de radicaux libres et la capacité de rétention calcique, la fonction mitochondriale a été étudiée en détails.

5.2.1 La perméabilisation de fibres, principes et intérêts

La préparation des fibres a été faite suivant la technique développée par Veksler en 1987 [304] et les modifications de Kuznetsov de 2008 [134], selon les recommandations de Picard en 2011 [305].

Le processus de préparation des fibres [306] s'est déroulé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le muscle d'intérêt a été prélevé, et placé dans un tampon de relaxation (Tampon A : CaK₂EGTA 2.77mM, K₂EGTA 7.23mM, MgCl₂ 6.56mM, DTT 0.5mM, K-MES 50mM, Imidazol 20mM, Taurine 20mM, Na₂ATP 5.3mM, Phosphocreatine 15mM, pH 7,3 à 4°C). Il a ensuite été dilacéré à l'aide de pince dans une boîte de Pétri sur la glace. Le principe de la dilacération est de séparer les fibres les unes des autres tout en les laissant reliées par un point afin de créer un ensemble. Lorsque la séparation a été terminée, les fibres ont été placées dans un bain de perméabilisation (Tampon A + Saponine 50ug/ml). La saponine est l'agent chimique permettant de créer des pores dans les membranes plasmiques des fibres. Après un rinçage en solution A et selon que les fibres seront destinées à l'analyse de la

respiration, la production de radicaux libres ou de la capacité de rétention calcique, chaque préparation a été lavée dans les bains correspondants soit, le B (Tampon B : CaK₂EGTA, 2.77mM , K₂EGTA 7.23mM , MgCl₂ 1.38mM , DTT 0.5mM, K-MES 100mM, Imidazol 20mM, Taurine 20mM, K₂HPO₄ 3mM, pH 7.3 à 4°C) pour la respiration, le Z (Tampon Z : K-MES 110mM , KCl 35mM , EGTA 1mM , MgCl₂ 3mM , K₂HPO₄ 10mM , BSA 0,5mM, pH 7.3 à 4°C) pour la production de radicaux libres, et la C (Tampon C : K-MES 80mM, HEPES 50mM, Taurine 20mM, DTT 0.5mM, MgCl₂ 10mM, ATP 10mM, pH 7.3 à 4°C) pour la capacité de rétention calcique. Au terme de ces lavages, les préparations destinées à la respiration et à la production de radicaux libres sont prêtes pour analyse. Il faudra à nouveau deux étapes pour que la préparation des fibres destinées à l'étude de la capacité de rétention calcique soit terminée, à savoir, la solubilisation des filaments de myosines à l'aide d'un tampon à haute teneur en KCl (Tampon D : KCl 800mM, HEPES 50mM, Taurine 20mM, DTT 0.5mM, MgCl₂ 10mM, ATP 10mM, pH 7.3 à 4°C), et le rinçage dans la solution de mesure (Tampon CRC : Sucrose 250mM , EGTA-Tris Base 5µM, Tris-MOPS 10mM, pH 7.3 à 4°C).

Il est essentiel que tout le processus se fasse à 4°C et que les fibres soient constamment immergées. La préparation doit être le plus rapide possible, mais la qualité de dissection constante pour ne pas influencer les résultats.

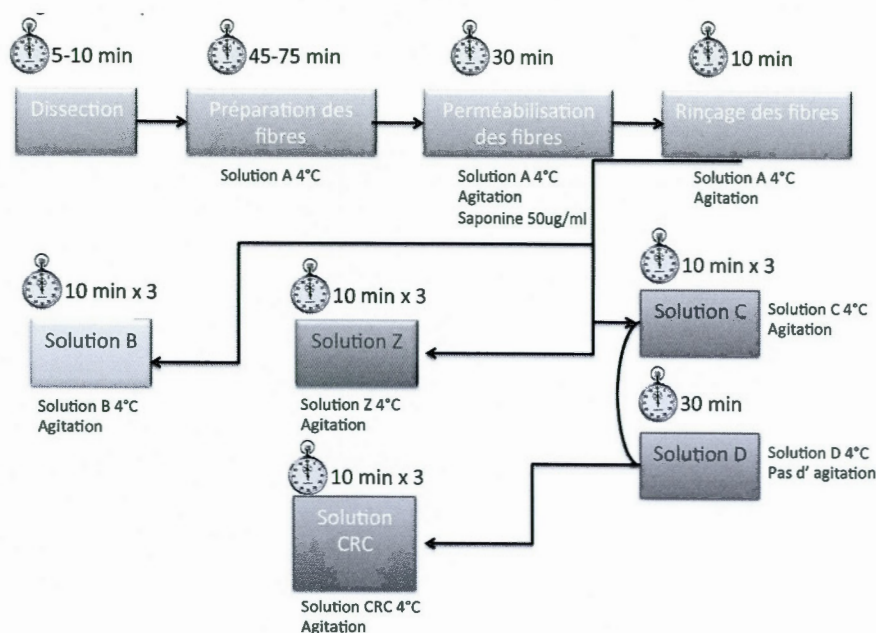


Figure 5.2 Schéma de la préparation des fibres

5.2.2 Respiration mitochondriale

L'évaluation de la respiration mitochondriale est en fait la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène après stimulation des différents complexes à 23°C [304]. Chaque unité de la chaîne respiratoire peut être modulée grâce à son substrat spécifique ou par un inhibiteur. La séquence d'ajout des différents produits permet ainsi d'isoler chaque complexe et d'en déterminer sa contribution à la respiration.

La séquence utilisée pour cette étude est la suivante. Après l'obtention d'un plateau stable des fibres uniquement (état I) dans 1 mL de Tampon B, on ajoute du glutamate

(2,5mM) et du malate (5mM) qui, en passant par le cycle de Krebs permettront de produire du $\text{NADH}+\text{H}^+$, le substrat du complexe I (état II). La chaîne respiratoire est alors lancée à faible régime, les complexes I, III et IV sont activés.

L'ajout d'ADP (2mM) accélère la synthèse d'ATP, créant une diminution du potentiel de membrane, les complexes accélèrent alors l'oxydation de leurs substrats pour extraire des protons à la membrane et rétablir le potentiel de membrane (état III).

L'ajout d'amytal (2mM) permet de couper l'activité du complexe I et de ralentir la respiration. L'ajout de succinate (10mM) apporte au complexe II son substrat, le FADH_2 , les complexes II, III et IV ainsi que l'ATP synthase sont activés.

Le Carbonyle Cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) est un protonophore permettant aux protons de traverser les doubles membranes lipidiques sans l'aide de canaux. L'ajout de CCCP (1 μM) dans la préparation entraîne les protons de l'espace inter-membranaire dans l'espace interne diminuant ainsi le gradient électrochimique et le potentiel de membrane. Afin de rétablir ces deux paramètres, les complexes de la chaîne respiratoire sont activés à leur vitesse maximale théorique (état découplé). L'ATP synthase ne subit plus la pression du potentiel de membrane, elle fonctionne alors comme une ATPase, consomme de l'ATP et rejette des protons à l'extérieur.

L'antimycine A (8 μM) est un inhibiteur du complexe III en agissant au niveau du cycle du coenzyme Q, il bloque le transfert des électrons. Ainsi la contribution des complexes I et II est bloquée.

Le TMPD-Ascorbate (0,9/9mM) est un donneur artificiel d'électrons au complexe IV, or son auto-réduction dans la cuve a tendance à consommer de l'oxygène, c'est pourquoi l'ajout de KCN (0,6mM) permet d'en mesurer la quantité par inhibition totale du complexe IV.

Sur fibres isolées, il est impossible d'accéder à un état IV, conséquences de la présence des ATPases endogènes qui fournissent de l'ADP en continue. Toutefois, il est possible de simuler un pseudo état IV en ajoutant de l'oligomycine, qui en inhibant le canal de proton FO bloque la synthèse d'ATP.

Le rapport de l'état III sur l'état II permet de contrôler la qualité de la respiration, c'est le RCR (*Respiratory Control Ratio*).

Les mesures sont effectuées grâce à des électrodes de Clark dans des cuves d'oxygraphie thermostatées (Hansatech, Norfolk, England). La calibration de la machine se fait en établissant dans un premier temps, la valeur maximale d'oxygène dans la cuve avec du tampon B. Celle-ci est d'environ 295 nmole.ml⁻¹. Dans un second temps, on prive le milieu d'oxygène grâce à du dithionite de sodium (Sigma, 157953) pour établir le zéro oxygène.

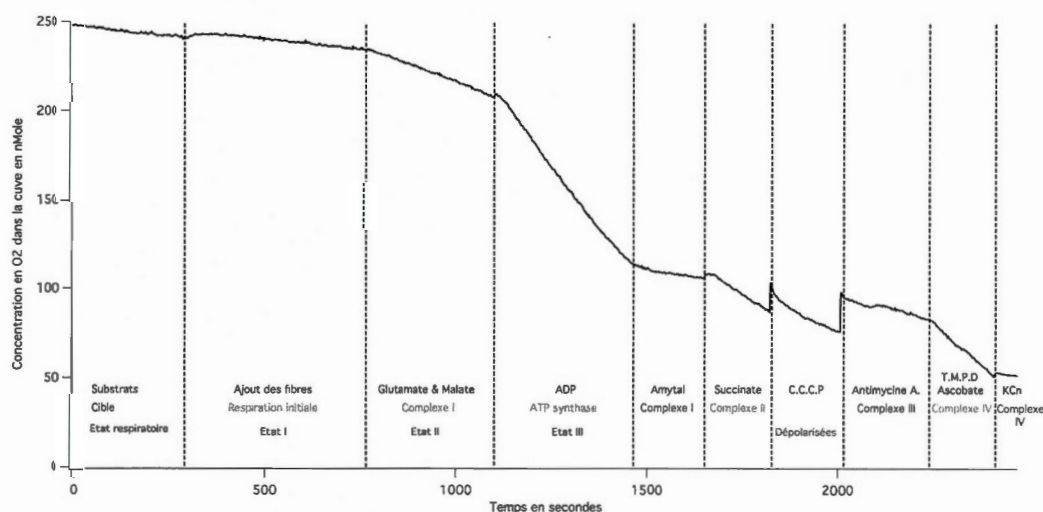


Figure 5.3 Courbe d'oxygraphie type

5.2.3 Production de radicaux libres

La mesure de la relâche nette d' H_2O_2 se fait via la résorufine, une sonde fluorescente (Amplex Red, Invitrogen, A12222) qui réagit au contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la Horse Radish Peroxydase (HRP) qui catalyse la réaction à 37°C [307].

Comme pour la respiration, on module l'activité des complexes grâce à des inhibiteurs ou des substrats, selon une séquence permettant de déterminer le rôle de chacun des complexes.

La séquence pour la production de radicaux libres est la suivante. Après l'enregistrement d'un signal fluorescent de base stable (Tampon Z 1ml, Amplex Red 50mM, HRP 1 μM) on ajoute les fibres, puis le substrat du complexe I le glutamate (2,5mM). Ensuite, on ajoute le substrat du complexe II, le succinate (10mM). On stimule ensuite l'ATP synthase avec de l'ADP (0,5mM), puis on bloque l'activité du complexe III grâce à l'antimycine A (10 μM).

On effectue les mesures grâce à un spectrofluoromètre (F 2500, Hitachi) dans des semi-micro cuves de quartz. La calibration s'effectue par ajouts successifs d'une quantité connue de peroxyde d'hydrogène, et l'établissement d'une équation du premier degré exprimant la fluorescence en fonction de la quantité de peroxyde d'hydrogène présent dans la cuve.

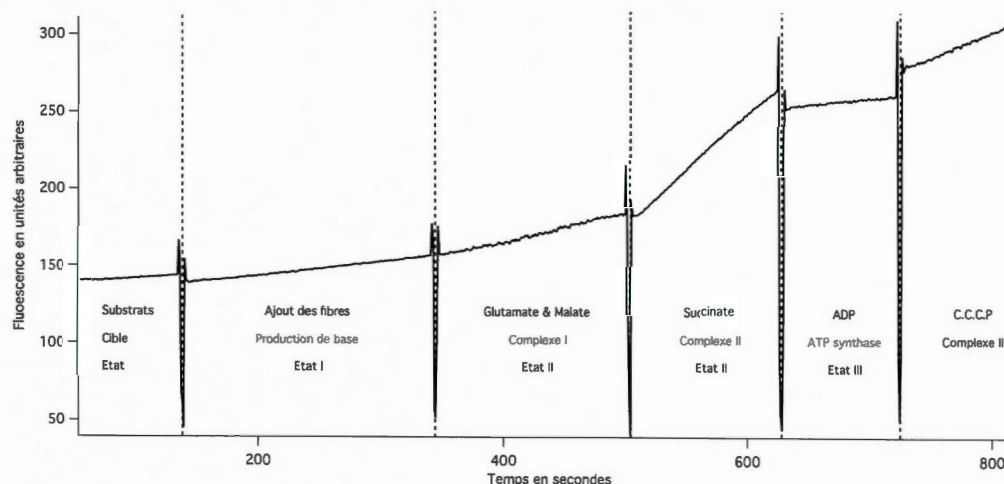


Figure 5.4 Courbe type de production de radicaux libres

5.2.4 Rétention calcique et ouverture du pore de perméabilité

L'obtention des valeurs de rétention calcique et de temps pour l'ouverture du pore de transition de perméabilité se fait également à 37°C grâce à une sonde fluorescente (Calcium green, Invitrogen, C3737) qui, après excitation et en présence de calcium émet une fluorescence [308].

La procédure commence par l'établissement d'un signal de fluorescence stable (environ 200 mU.A FI) modulé par l'EGTA (Fluka, 03779), un chélateur d'ions divalents comme le calcium (Tampon CRC 1ml, thapsigargine 1 μ M, Ca-Green 1 μ M, Glutamate 5mM, malate 2,5mM, Phosphate inorganique (Pi) 10mM). Puis les fibres sont introduites dans la chambre de quartz et une quantité connue de calcium y est ajoutée (8nMoles).

Théoriquement, le signal augmente (800-1200 mU.A Fl) et les mitochondries commencent alors à capter le calcium. Le signal diminue jusqu'à atteindre un plateau, la dérivé de la courbe devient nulle, c'est à ce point qu'on estime que les mitochondries ont ouvert leurs pores de transition de perméabilité. La quantité de calcium prise, ainsi que le temps avant l'ouverture sont calculés grâce à ce point.

Ainsi on calcul la quantité de calcium prise comme suit :

$$\text{Quantité de } Ca^{2+} = \frac{F_{max} - F_{\frac{dy}{dx}=0}}{F_{max} - F_{min}} \times 8$$

La quantité de calcium est exprimée en nMole de Ca^{2+} , F_{min} est la fluorescence du signal de base, F_{max} la fluorescence au pic après l'ajout de calcium, et $F_{\frac{dy}{dx}=0}$ est la fluorescence au point d'inflexion de la courbe. Huit représente en nMole la quantité de calcium ajoutée.

On mesure le temps d'ouverture du pore de la même façon :

$$TPO = T_{max} - T_{\frac{dy}{dx}=0}$$

Le TPO (*Time to Pore Opening*) s'exprime en secondes, T_{max} est le temps au pic après l'ajout de calcium, et $T_{\frac{dy}{dx}=0}$ le temps au point d'inflexion de la courbe.

La calibration se fait par ajouts successifs de quantités connues de calcium du niveau basal au niveau maximal du pic. On s'aperçoit alors que la relation entre la quantité de calcium et la fluorescence n'est pas linéaire mais exponentielle. Toutefois l'ajout de 8 nMole de calcium permet d'être dans la partie linéaire de la courbe et de ne pas avoir à corriger les valeurs obtenues.

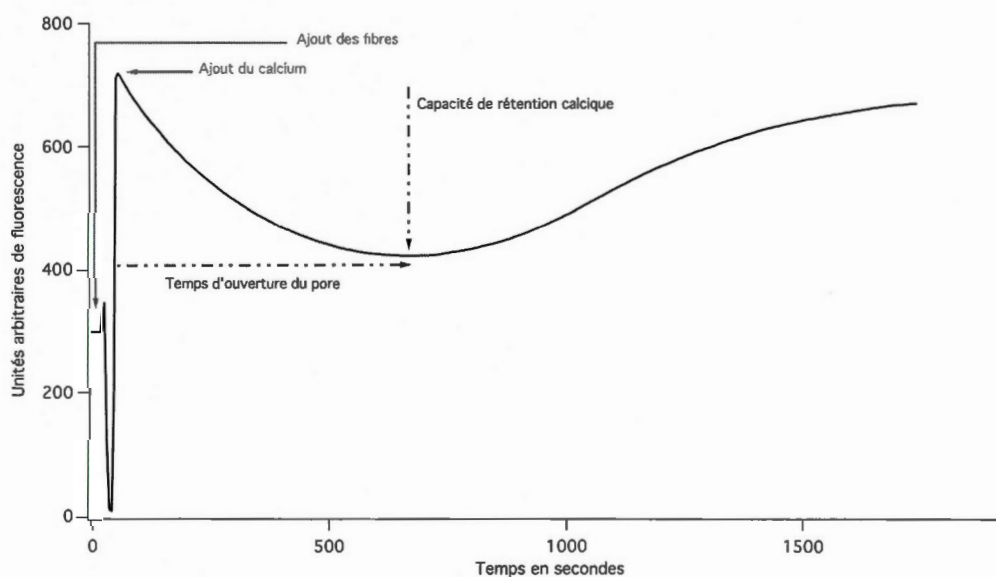


Figure 5.5 Courbe type de la mesure de rétention calcique et de l'ouverture du pore

5.3 Activités des complexes de la chaîne respiratoire

Les activités des complexes enzymatiques qui constituent la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs peuvent également être mesurées de façon spécifique et en dehors d'un contexte physiologique mitochondrial. On peut ainsi mesurer l'activité des complexes I, II (SDH), IV (COX) et celle de la citrate synthase (CS) par une méthode spectrophotométrique [307].

Le principe de chaque dosage, est qu'après l'obtention d'un homogénat du tissu d'intérêt (Tampon d'homogénéisation : EDTA 1mM, Triethanolamine 50mM), on fournisse à chacun des complexes un substrat qui lui est propre et dont on peut suivre la variation d'absorption au cours du temps. Chaque échantillon est mesuré en triplicata, afin de minimiser la variabilité expérimentale.

On mesure l'activité du complexe I grâce aux variations d'absorbance du NADH à 340nm. En présence de decylubiquinone, le complexe I oxyde le NADH en NADH₂. On inhibe les complexes III et IV avec de l'antimycine A et du KCN, pour isoler l'activité du complexe I. Afin de retirer l'oxydation non spécifique du NADH, on inhibe à la fin de la réaction le complexe I avec de la roténone (20mM) et l'activité est déterminée comme la différence des pentes. Le coefficient d'extinction molaire du NADH à 340nm est 6220 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Tableau 5.1 Composition du tampon de mesure du complexe I

Composants	Concentration Finale
Tampon Kpi 50mM	50mM-2mM
BSA	1mg/mL
KCn	250mM
NADH	200mM
Antimycine A	0,4mM
Decylubiquinone	100mM

L'équation du calcul des activités peut être écrite comme suit :

$$\text{Activité C I en } mU.mg^{-1} = \left[\frac{(Pente * \Delta D)}{(\epsilon M \times l)} \right] \times \left[\frac{V}{m} \right]$$

Où la *Pente* est en $DO.min^{-1}$, ΔD est le facteur de dilution de l'échantillon, ϵM le coefficient d'extinction molaire du NADH, l le trajet optique en cm (0,552 cm en plaque 96 puits), V le volume dans la cuve en nL et finalement m la quantité de protéines en mg.

L'activité du complexe II se fait par la mesure des changements d'absorbance du DCIP (Sigma, 33125) à 600nm. L'oxydation du succinate et de la decylubiquinone par le complexe II permet la réduction du DCIP dont l'absorbance diminue. L'ajout de rotenone pour bloquer le complexe I et de KCN pour inhiber le complexe IV, permet de bloquer le flux d'électron. On peut mesurer l'auto-réduction du DCIP en ajoutant du malonate (10mM) qui inhibe le complexe II et ainsi, corriger les valeurs des pentes obtenues. Le coefficient d'extinction molaire du DCIP est de $16,3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. L'équation de calcul est la même que pour le complexe I.

Tableau 5.2 Composition du tampon de mesure du complexe II

Composants	Concentration Finale
Tampon Kpi-EDTA 50mM-2mM	50mM-2mM
BSA	1mg/mL
KCn	240mM
Rotenone	4mM
Antimycine A	0,4mM
Decylubiquinone	100mM
DCIP	100mM
Succinate	10mM
ATP	200mM

L'activité du complexe IV est mesurée via la diminution de l'absorbance du cytochrome c oxydé par celui-ci. Pour ce faire, il faut fournir au complexe IV du cytochrome c réduit et purifié. Le coefficient d'extinction molaire du DCIP est de $29,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. L'équation de calcul est la même que pour le complexe I.

Tableau 5.3 Composition du tampon de mesure du complexe IV

Composants	Concentration Finale
Tampon Kpi 50mM	25mM
Dodecylmaltoside	0,1%
Cytochrome C	100mM

La citrate synthase est la première enzyme du cycle de Krebs qui permet la transformation d'une molécule d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate en citrate et libérant du CoA-SH. On peut suivre l'activité de la CS par le changement d'absorbance du DTNB (Sigma, D8130) à 412 nm. Le groupement thiol du CoA-SH, va cliver le pont disulfure du DTNB, pour générer du 2 NTB⁻. Dans l'eau, le NTB⁻ s'ionise en NTB²⁻ qui a une couleur jaune et absorbe la lumière à 412nm. On peut donc suivre l'activité de la CS via la conversion du DTNB. Le coefficient d'extinction molaire du DCIP est de $13,6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. L'équation de calcul est la même que pour le complexe I.

Tableau 5.4 Composition du tampon de mesure de la citrate synthase

Composants	Concentration Finale
Tris 200mM	100mM
Acetyl CoA	200mM
DTNB	200mM
Triton X-100 10%	1%
H2O	

5.4 Évaluation du contenu mitochondrial via des marqueurs protéiques

5.4.1 Préparation des échantillons

Il est également possible d'évaluer le contenu mitochondrial en mesurant des marqueurs tels que des protéines mitochondriales, et de faire le ratio protéines mitochondriales sur protéines non mitochondriales.

Les protéines sont extraites après dilacérations des muscles dans du tampon RIPA [309] (*Radio-Immuno-Precipitation Assay*) contenant l'inhibiteur de protéase (cOmplete, Roche). La préparation est ensuite homogénéisée mécaniquement dans un robot à l'aide de billes métalliques à 4°C. Les surnageant sont récupérés après

centrifugation à 4°C 20 minute-12000 rpm. Le contenu protéique est dosé par la méthode de l'acide bicinchoninique BCA [310].

Une fois les échantillons préparés et dosés, l'identification des protéines d'intérêt se fait par western blot [311, 312]. Le principe général est qu'après séparation des protéines selon leur poids moléculaire sur un gel d'acrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate –PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), elles sont transférées sur une membrane de PVDF (*PolyVinyle Dene Fluoride*) grâce à l'application d'un champ électrique. Par la suite, grâce à des anticorps spécifiques, on révèle la présence de protéines que l'on peut également quantifier, grâce à une réaction de chimioluminescence entre un anticorps couplé à une enzyme, et du luminol. La lumière émise est imprimée sur des films radiographiques.

5.4.2 Détection des protéines d'intérêts

Les marqueurs du contenu mitochondrial mesurés sont principalement des protéines membranaires mitochondriales dont certaines sous-unités de la chaîne respiratoire qui peuvent être détectées par le cocktail MitoProfil® Total OXPHOS (Abcam ab110413) (CI : NDUFB8 ; CII : SDHB ; CIII : UQCRC2 ; CIV : MTCO1 ; ATP synthase : ATP5A), et différentes protéines de la membrane externe, comme VDAC (Cell signalling 4866) et TOM70 (SantaCruz C-18).

Pour chaque protéine détectée, il est important d'obtenir sur la même membrane un contrôle interne afin d'attester que les quantités de protéines totales sont les mêmes

entre les échantillons. Pour ce faire, il est possible, de quantifier une protéine connue pour sa stabilité telle que la Beta-Tubulin ou la GAPDH. Il est également possible de révéler l'ensemble des protéines présentes sur la membrane et de la quantifier grâce au rouge Ponceau (Ponceau S Solution, Biotium, 22001).

5.5 Flux autophagique et mitophagie

L'étude de l'autophagie peut se faire via plusieurs paramètres et selon plusieurs méthodes comme décrit par Klionsky [262]. Une des méthodes les plus utilisées et parmi les plus fiables, est l'évaluation du flux autophagique [313, 314], c'est-à-dire la mesure de la formation d'auto-phagosome. Comme décrit au chapitre sur l'autophagie, après fermeture de la double membrane autour des protéines ou de l'organelle à dégrader, l'auto-phagosome fusionne avec un lysosome pour dégradation. Pour mesurer le taux de formation de ceux-ci, il est donc nécessaire de bloquer la fusion et ainsi empêcher la dégradation des structures d'autophagie

5.5.1 Drogue et protocole animal

Il existe plusieurs drogues empêchant la formation des auto-lysosomes qui agissent à différents niveaux et à différents taux de réponses comme décrit par Klionsky [262].

La chloroquine, aussi connue sous le nom de résochine, est avant tout un anti-paludique utilisé dans les années 1940. Elle sert également d'antibiotique et d'agent de transfection. Concernant l'autophagie, la chloroquine empêche la fusion des autophagosomes. La chloroquine est injectée en IP à 50 mg/kg/jour pendant 4 jours, le quatrième jour les souris sont mises à jeun et sacrifiées 24 heures après. La mise à jeun permet de stimuler l'autophagie et ainsi d'augmenter le nombre d'autophagosomes observables.

La chloroquine a été choisie parmi les autres choix afin de maintenir une cohérence avec les protocoles de nos collaborateurs à des fins de publication. L'usage de cette drogue sur les animaux a été implémenté au protocole de santé animale (#13-062), sous les conditions décrites précédemment.

5.5.2 Détection et résultats

Après avoir injecté les animaux selon le protocole établi pour la chloroquine, les animaux sont sacrifiés et les muscles (Gastrocnemius (GAS), Tibialis anterior (TA), Extensor Digitorum Longus (EDL), Diaphragme (DIA), et Cœur (HRT)) prélevés et congelés dans l'azote liquide.

Ces échantillons sont préparés comme décrit au paragraphe V.D.

Les principaux marqueurs d'autophagie étudiés seront le ratio LC3 II/ LC3 I, et le contenu en p62.

Quant à la mitophagie, qui ne peut-être quantifié de manière spécifique, elle sera estimée en comparant l'abondance de protéines mitochondriales à l'état basal et en présence d'une inhibition de la dégradation des auto-phagosomes par la chloroquine.

5.6 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS (version 20.0 ; SPSS inc., Chicago, IL, USA). Des statistiques descriptives ont été utilisées afin de présenter les caractéristiques des animaux. La distribution des données a été vérifiée par un test de Skewness-Kurtosis avant de conduire des t-tests entre les différents groupes d'intérêts. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significativement différentes.

Les résultats sont présentés \pm leurs S.E.M (*Standard Error to the Mean*).

CHAPITRE VI

RÉSULTATS

Dans cette section seront consignés les résultats des expérimentations menées tout au long du projet. Dans un premier temps seront présentés les résultats concernant le modèle transgénique *mdx-Park2* afin d'évaluer l'effet de la perte d'expression du gène codant pour la protéine PARKIN sur le phénotype mitochondriale des souris *mdx*.

Dans un second temps seront présentés les résultats concernant le modèle transgénique *mdx-NAF-1* afin d'évaluer l'impact de la diminution d'expression du gène codant pour la protéine NAF-1 sur l'autophagie au niveau du muscle strié squelettique et ses répercussions sur la fonction mitochondriales chez les souris *mdx*.

6.1 Caractérisation phénotypique des souris *mdx-Park2*^{-/-}

En ce qui concerne le modèle *mdx-Park2*^{+/+}, nous avons observé que les souris ne présentaient aucun phénotype pathologique visible, et ont connu une prise de poids significative ($p=0,0001$) normale entre la 6^{ième} et la 12^{ième} semaine d'âge, périodes correspondant respectivement aux vagues de dommage myonécrotique et de régénérescence (figure 6.1 et tableau 6.1). Cette prise de poids entre la 6^{ième} et la 12^{ième} semaine a également été observée chez les souris *mdx-Park2*^{-/-} ($p=0,0001$). Par ailleurs, l'inactivation de *Park2* chez la souris *mdx-Park2*^{-/-} n'a induit aucune

modification de poids corporel tant à 6 ($24,22 \pm 0,64$ g versus $23,80 \pm 0,88$ p= 0,701) qu'à 12 semaines ($29,27 \pm 0,45$ g versus $28,53 \pm 0,57$ p= 0,317). Par ailleurs, comme les souris contrôles, les souris *mdx-Park2^{-/-}* ne présentaient aucun signe visible de pathologie, aucun suivi phénotypique supplémentaire n'a été poursuivi.

Tableau 6.1 Effet de l'ablation de PARKIN sur la masse des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=14)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=10)	p	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=17)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=17)	12	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)										
Masse (g)		24,22 ± 0,64	23,80 ± 0,88	0.701	29,27 ± 0,45	28,53 ± 0,57		0.317	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> 0,0001	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> 0,0001

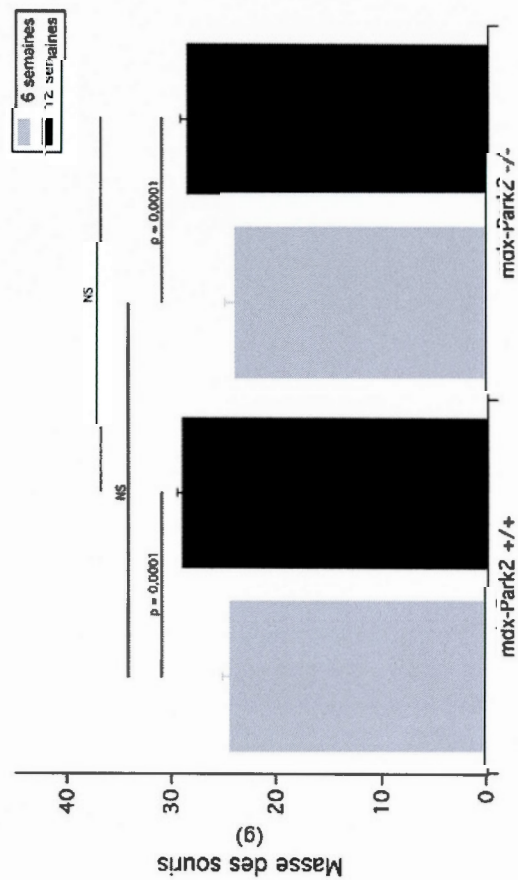


Figure 6.1 Effet de l'ablation de PARKIN sur la masse des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Les masses sont mesurées en gramme, les résultats sont une moyenne des valeurs mesurées pour chaque groupe \pm S.E.M.
 Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

6.2 Impact de la perte d'expression de PARKIN sur l'autophagie et la mitophagie chez la souris *mdx*

Tel que présenté à la Figure 6.2, l'inactivation de *Park2* n'a pas entraîné de variation significative du rapport LC3-II/LC3-I chez la souris *mdx*. Toutefois, à 6 semaines d'âge, le rapport LC3-II/LC3-I tendait à être 20% ($p=0,085$) plus élevé dans le *gastrocnemius* des souris *mdx-Park2^{-/-}* comparativement à leur contrôle *mdx-Park2^{+/+}*. Tandis qu'aucune variation due à l'âge n'a été observée chez les souris *mdx-Park2^{+/+}* ($p=0,234$), l'autophagie tendait à être 22% ($p=0,081$) plus faible chez les souris mutantes entre 6 et 12 semaines. Ces données laissent penser qu'une diminution de la dégradation spécifique des mitochondries aie pu entraîner une activation plus prononcée de la dégradation générale.

Tableau 6.2 Effet de l'ablation de PARKIN sur le ratio LC3 II/I chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=6)	p	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=6)	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)			6			12			
Ratio LC3 II/I {U.A}		0,665 ±0,080	0,841 ±0,032	0.085	0,792 ±0,059	0,657 ±0,089	0.235	0,234	0,081

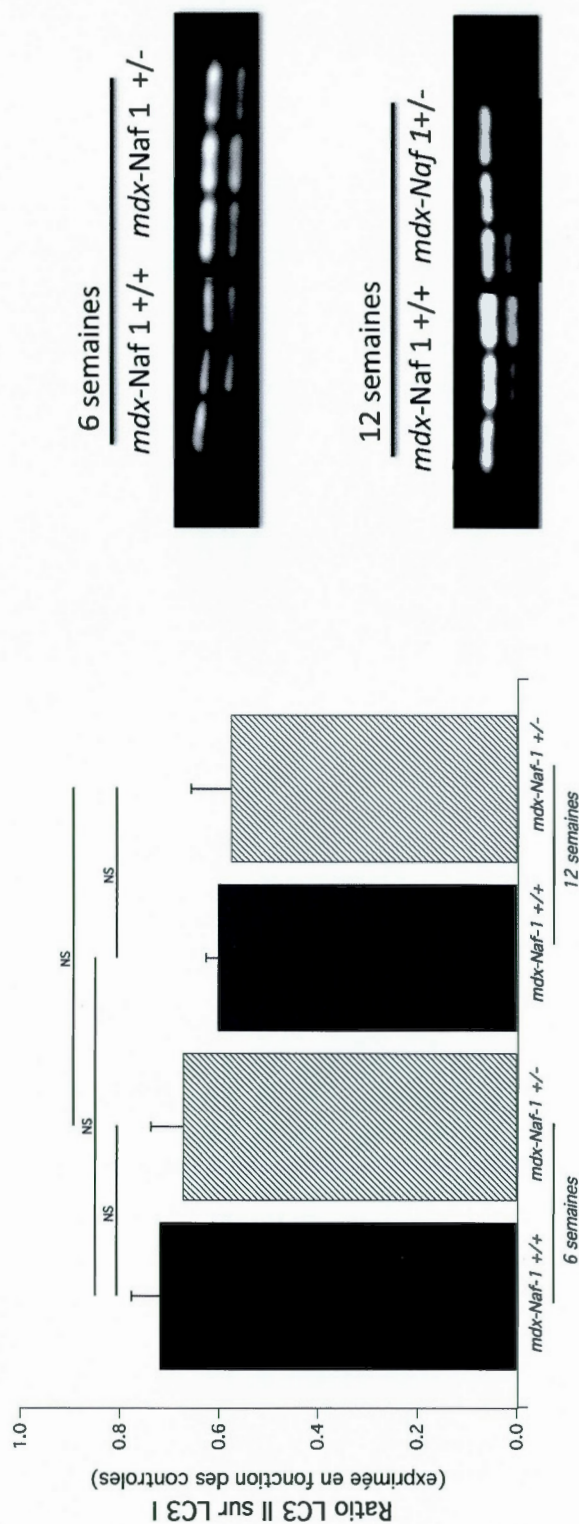


Figure 6.2 Effet de l'ablation de PARKIN sur le ratio LC3 II/I chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

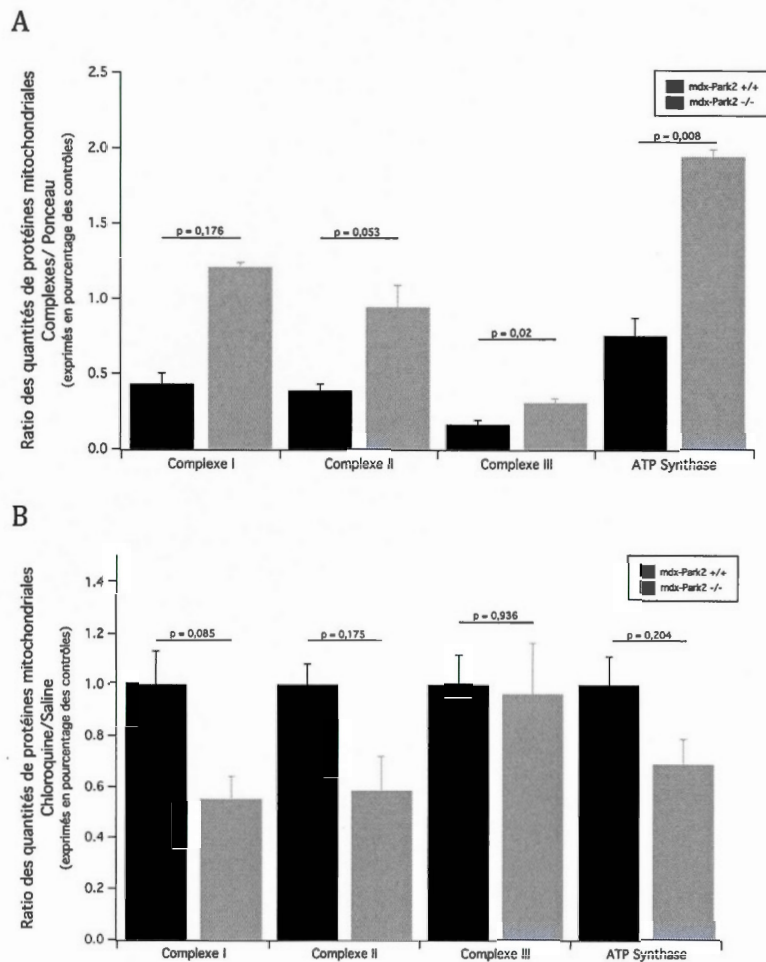
Les quantités de protéines ont été mesurées par Western-Blot (LC3II #2775 Cell signaling 1/1000). Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

En ce qui a trait à la mitophagie, la Figure 6.3 indique que durant la phase myonécrotique, la quantité de protéines du complexe II tendait fortement à être supérieure ($p=0,053$) tandis que les quantités de protéines du complexe III et de l'ATP synthase étaient significativement supérieures ($p= 0,02$ et $0,008$) dans le *gastrocnemius* des souris *mdx-Park2^{-/-}* comparativement aux souris contrôles *mdx-Park2^{+/+}*. En réponse à la chloroquine, l'accumulation de protéines mitochondriales ne semblait toutefois pas être modifiée chez les souris *mdx-Park2^{-/-}*.

Bien que préliminaires ces résultats suggèrent donc que l'absence de PARKIN pourrait réduire la dégradation sélective des mitochondries dans le muscle des souris *mdx*.

Tableau 6.3 Effet de l'ablation de PARKIN sur la mitophagie chez la souris *mdx* à 6 semaines

Substrats	Génotype	6		p
Age (semaines)				
Quantité de protéines du Complexe I (U.A)		0,432 ±0,070	1,21 ±0,29	0,176
Quantité de protéines du Complexe II (U.A)		0,388 ±0,041	0,944 ±0,146	0,053
Quantité de protéines du complexe III (U.A)		0,165 ±0,028	0,310 ±0,027	0,020
Quantité de protéines de l'ATP synthase (U.A)		0,76 ±0,114	1,949 ±0,046	0,008
Ratio de l'accumulation du Complexe I (U.A)		0,803 ±0,130	0,442 ±0,090	0,085
Ratio de l'accumulation du Complexe II (U.A)		0,742 ±0,080	0,434 ±0,134	0,175
Ratio de l'accumulation du Complexe III (U.A)		0,655 ±0,109	0,632 ±0,199	0,936
Ratio de l'accumulation de l'ATP synthase (U.A)		0,723 ±0,110	0,500 ±0,098	0,204



(A) Quantité de protéines mitochondriales. (B) Ratio des quantités de protéines mitochondriales avant et après inhibition de la fusion des auto-phagosomes. (C) Représentation des western-blots. Les quantités de protéines sont mesurées par Western-Blot (Oxphos Cocktail, ab110413, Abcam 1/1000). Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

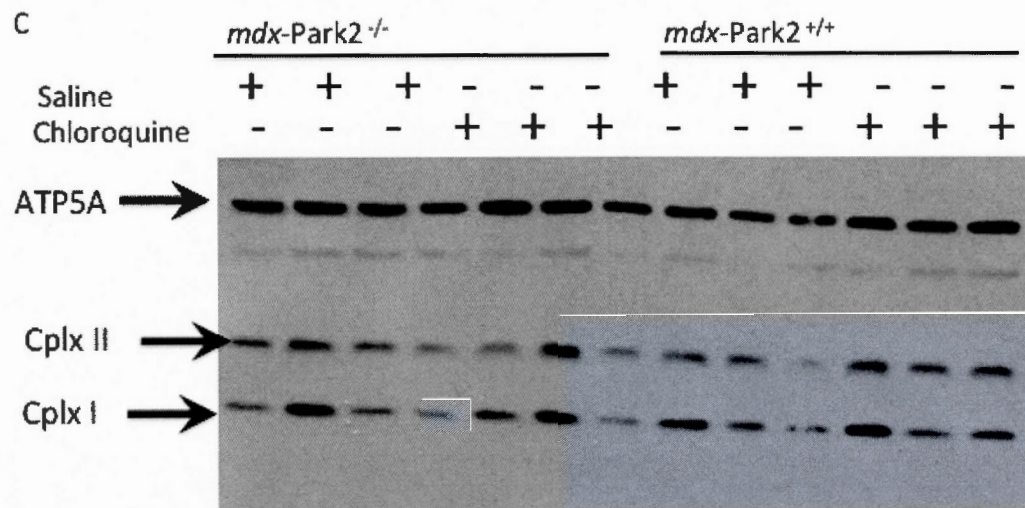


Figure 6.3 Effet de l'ablation de PARKIN sur la mitophagie chez la souris *mdx* à 6 semaines

(A) Quantité de protéines mitochondriales. (B) Ratio des quantités de protéines mitochondriales avant et après inhibition de la fusion des auto-phagosomes. (C) Représentation des western-blots. Les quantités de protéines sont mesurées par Western-Blot (Oxphos Cocktail, ab110413, Abcam 1/1000). Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

6.3 Impact de la perte d'expression de PARKIN sur les fonctions mitochondriales de la souris *mdx*

De manière à investiguer si une inhibition de la mitophagie dépendante de PARKIN résulte en l'accumulation d'organelles dysfonctionnelles dans le muscle dystrophique, la fonction mitochondriale a été étudiée au travers de différents

paramètres dans le *gastrocnemius* sur des homogénats frais de muscle et des fibres perméabilisées à la saponine.

Afin de vérifier les fonctions mitochondriales, la respiration, la relâche nette d'H₂O₂, et les caractéristiques du mPTP ont été mesurées sur fibres perméabilisées.

Tel que le montre la figure 6.4, l'analyse de divers états respiratoires ainsi que la mesure de l'ACR, un index de la qualité du couplage entre oxydation et phosphorylation, n'a révélé aucune différence significative entre les souris *mdx-Park2*^{-/-} et leurs contrôles *mdx-Park2*^{+/+}. Par ailleurs, dans les deux souches de souris, les fonctions respiratoires à la 6^{ième} et la 12^{ième} semaine étaient comparables à l'exception de la vitesse de consommation d'oxygène lors du découplage des mitochondries qui augmente significativement chez les souris *mdx-Park2*^{-/-} entre 6 et 12 semaines (1,16 ± 0,09 versus 1,60 ± 0,13 nmole d'O₂/min/mg p= 0,011).

Tableau 6.4 Effet de l'ablation de PARKIN sur la respiration mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	6				12			
Age (semaines)		<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p		<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p	
Glutamate									
Malate (nmole d'O ₂ /min/mg)		0,99 ± 0,11	0,93 ± 0,12	0,908		1,24 ± 0,19	1,17 ± 0,18	0,687	p (6 vs 12) <i>mdx-Park2^{-/-}</i>
ADP (nmole d'O ₂ /min/mg)		3,40 ± 0,37	3,20 ± 0,37	0,609		2,96 ± 0,21	3,42 ± 0,32	0,356	0,542
Succinate (nmole d'O ₂ /min/mg)		1,80 ± 0,20	1,39 ± 0,11	0,160		1,89 ± 0,16	1,65 ± 0,12	0,624	0,170
CCCP (nmole d'O ₂ /min/mg)		1,53 ± 0,15	1,16 ± 0,09	0,058		1,79 ± 0,10	1,60 ± 0,13	0,239	0,011
TMPD/Ascorbat ^e (nmole d'O ₂ /min/mg)		2,45 ± 0,24	2,16 ± 0,18	0,167		2,36 ± 0,28	2,62 ± 0,32	0,445	0,147
ACR (U.A)		3,62 ± 0,24	4,06 ± 0,61	0,587		3,51 ± 0,29	3,51 ± 0,46	0,696	0,529

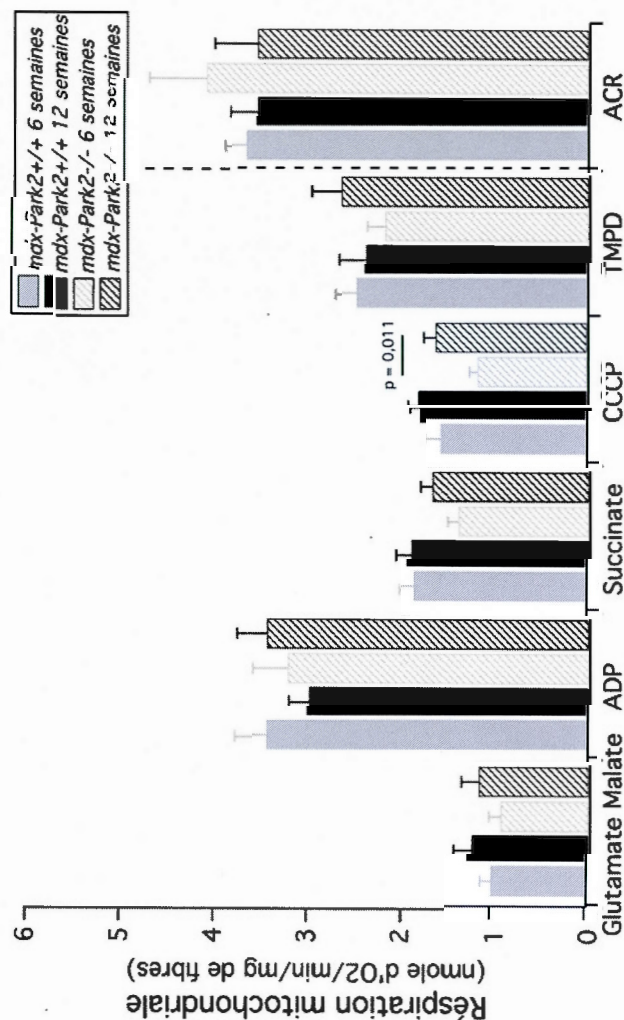


Figure 6.4 Effet de l'ablation de PARKIN sur la respiration mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Les vitesses de respiration sont exprimées en nmole d'O₂/min/mg de fibre sèches. ADP Adénosine Di-Phosphate ; CCCP Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazon; TMPD N,N,N',N' -TetraMethyl-p-PhenyleneDiamine; ACR Acceptor Control Ratio Les résultats correspondent à la moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en duplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

De plus, comme l'indique la figure 6.5, aucune variation significative de la relâche nette d' H_2O_2 n'a été constatée entre les souris *mdx-Park2^{-/-}* et leurs contrôles *mdx-Park2^{+/+}*. Comme chez les souris *mdx-Park2^{+/+}*, des diminutions significatives de la relâche d' H_2O_2 stimulée par le succinate (*mdx-Park2^{+/+}* $p = 0,024$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,034$), par (*mdx-Park2^{+/+}* $p = 0,015$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,008$) et l'Antimycine A. (*mdx-Park2^{+/+}* $p = 0,012$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,001$), ont été observées chez les souris *mdx-Park2^{-/-}* entre 6 et 12 semaines.

Tableau 6.5 Effet de l'ablation de PARKIN sur la relâche nette d'H₂O₂ mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	semaines					
Age (semaines)		<i>mdx-Park2^{+/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p	<i>mdx-Park2^{+/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p
État basal (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		3,47 ± 0,74	2,83 ± 0,38	0,568	3,10 ± 0,46	2,60 ± 0,46	0,461
Glutamate (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		3,11 ± 0,52	3,21 ± 0,64	0,945	2,05 ± 0,26	1,70 ± 0,21	0,452
Succinate (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		65,84 ± 8,24	52,57 ± 7,56	0,446	27,36 ± 2,46	29,0 ± 0,28	0,672
ADP (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		2,45 ± 0,45	2,84 ± 0,62	0,496	1,0 ± 0,19	1,10 ± 0,33	0,622
Antimycine A (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		24,86 ± 2,70	24,97 ± 1,74	0,674	12,97 ± 1,04	13,96 ± 1,63	0,740

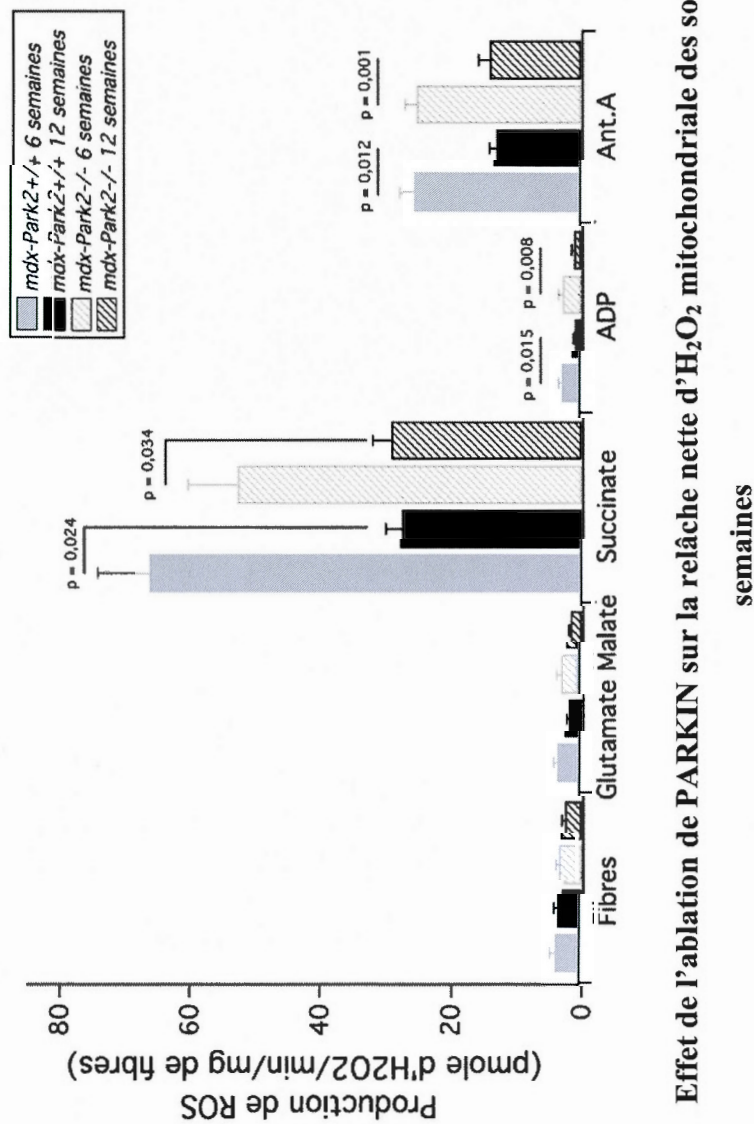


Figure 6.5 Effet de l'ablation de PARKIN sur la relâche nette d'H₂O₂ mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

La relâche nette d'H₂O₂ est mesurée en pmole d'H₂O₂/min/mg de fibre sèches. ADP Adénosine Di-Phosphate ; Ant.A Antimycine A.. Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en duplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives

La sensibilité au calcium du pore de transition de perméabilité n'a pas été modifiée suite à l'inactivation de *Park2*. Comme le montre la figure 6.6, la capacité de rétention calcique (CRC) était similaire dans les deux souches de souris à la 6^{ième} et la 12^{ième} semaine. De la même manière pour le temps d'ouverture du pore (TOP), la figure 6.6 ne montre aucune différence significative entre les souris *mdx-Park2*^{-/-} et leurs contrôles *mdx-Park2*^{+/+}, à 6 et 12 semaines.

Tableau 6.6 Effet de l'ablation de PARKIN sur la CRC et le TOP mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)									
CRC									
d'H ₂ O ₂ /min/mg		1,09 ± 0,36	0,75 ± 0,19	0,141	0,87 ± 0,47	0,45 ± 0,11	0,113	0,090	0,159
TOP									
d'H ₂ O ₂ /min/mg		166,5 ± 53,3	98,6 ± 33,2	0,089	132 ± 46,4	86,7 ± 19,7	0,168	0,223	0,450

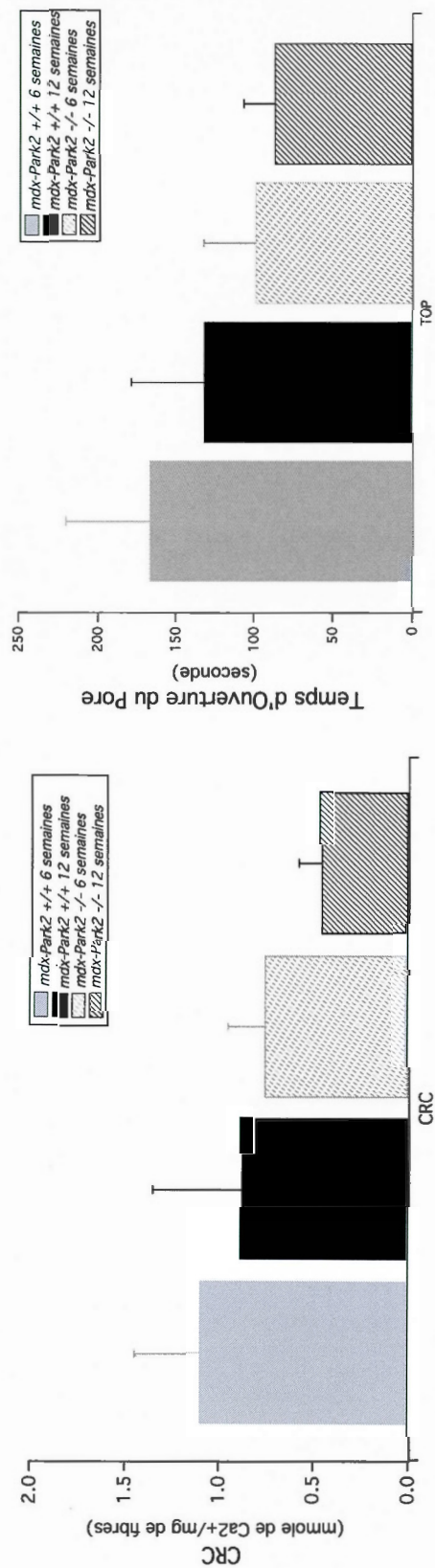


Figure 6.6 Effet de l'ablation de PARKIN sur la CRC et le TOP mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

La CRC est mesurée en nmole de Ca²⁺/mg de fibres sèches. Le TOP est mesuré en seconde. Les résultats sont une moyenne de des mesures réalisées pour chaque groupe en duplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives

Dans le but de vérifier l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que le contenu mitochondrial, nous avons procédé à la mesure de l'activité enzymatique des complexes I, II, IV et de la Citrate Synthase (CS) sur homogénats frais de muscle.

L'analyse de ces activités enzymatique n'a révélé aucune différence significative entre les souris *mdx-Park2^{-/-}* et leurs contrôles *mdx-Park2^{+/+}* comme le montre la figure 6.7.

La régénération a entraîné sur nos deux souches murines une augmentation significative de la CS (*mdx-Park2^{+/+}* $p=0,004$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,018$) et de l'activité du complexe IV (*mdx-Park2^{+/+}* $p=0,009$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,001$) et, une diminution significative de l'activité du complexe I (*mdx-Park2^{+/+}* $p=0,009$ et *mdx-Park2^{-/-}* $p = 0,019$).

Globalement, les analyses fonctionnelles indiquent donc que l'inactivation de PARK2 n'a induit aucun effet significatif sur les fonctions mitochondriales.

Tableau 6.7 Effet de l'ablation de PARKIN sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	12						p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)		<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{+/+}</i> (n=7)	<i>mdx-Park2^{-/-}</i> (n=7)
Complexe I (mU/mg de protéines)		0,013 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,150	0,001	0,001	0,001	0,019
Complexe II (mU/mg de protéines)		8,06 ± 2,68	15,77 ± 4,67	11,74 ± 2,55	12,42 ± 2,40	0,860	0,390	0,521	0,521	0,521
Complexe IV (mU/mg de protéines)		37,83 ± 5,33	40,70 ± 5,97	123,56 ± 17,4	143,47 ± 16,9	0,686	0,009	0,001	0,001	0,001
Citrate Synthase (mU/mg de protéines)		79,49 ± 14,43	96,37 ± 15,77	154,31 ± 4,60	179,77 ± 24,9	0,358	0,004	0,018	0,018	0,018

(A) Activité du complexe I. (B) Activité du complexe II. (C) Activité du complexe IV. (D) Activité de la citrate synthase. Les activités enzymatiques sont mesurées en mU/mg de protéine, les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en triplicata ± S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de p < 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

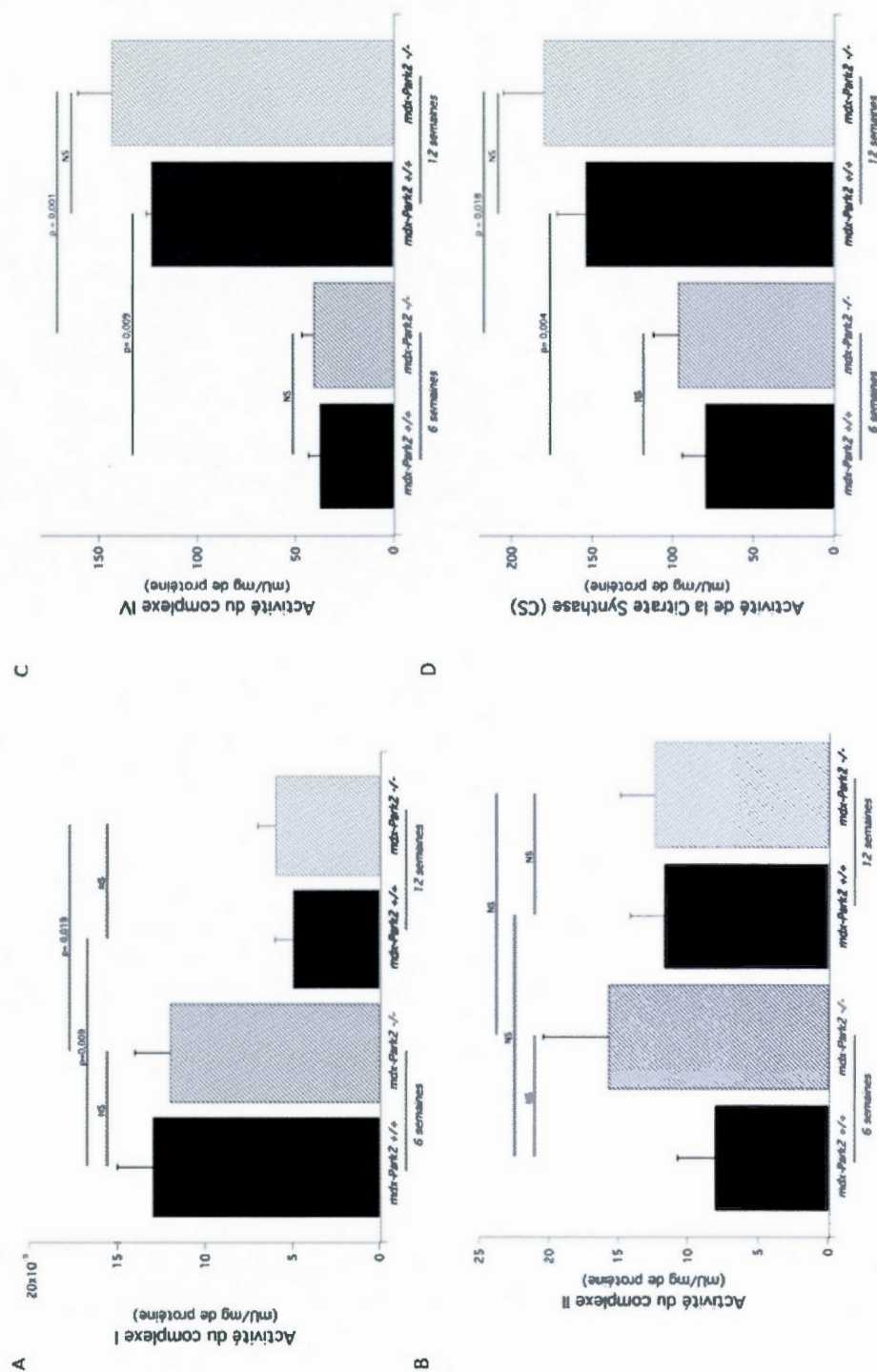


Figure 6.7 Effet de l'ablation de PARKIN sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

6.4 Caractérisation phénotypique des souris *mdx-Naf-1^{+/-}*

Les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* âgées de 6 semaines, ne présentaient aucun signe de variation des caractéristiques phénotypiques. De même, à 12 semaines d'âges ces souris ne présentaient aucun signe de pathologie, celles-ci ont eu une prise de poids significative ($p=0,001$) comparable à leurs contrôles (*mdx-Naf-1^{+/+}* $p=0,01$) entre la 6^{ème} et la 12^{ème} semaine d'âge, périodes correspondant respectivement aux vagues de dommage myonécrotique et de régénérescence (figure 6.8 et tableau 6.8). Pour ces raisons, aucun suivi phénotypique supplémentaire n'a été mené.

Tableau 6.8 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la masse des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=9)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=10)	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)			6			12			
Masse (g)		28,30 ± 0,90	27,60 ± 1,40	0.714	33,0 ± 1,50	34,15 ± 3,30	0.509	0,01	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> 0,001

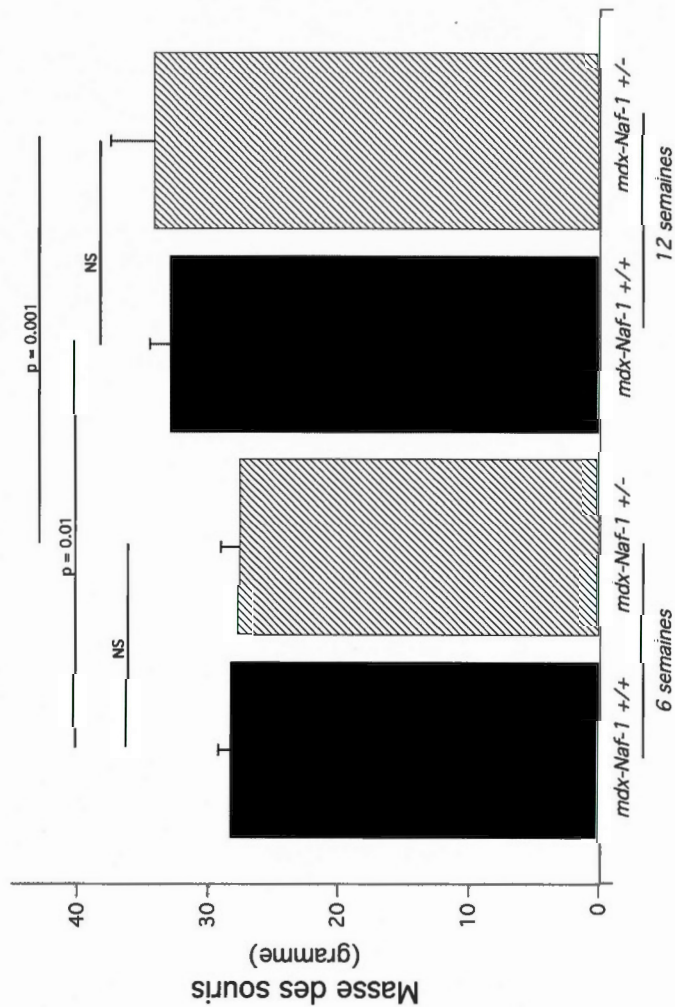


Figure 6.8 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la masse des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Les masses sont mesurées en gramme, les résultats sont une moyenne des valeurs mesurées pour chaque groupe \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives

6.5 Impact de la perte d'expression partielle de NAF-1 sur l'autophagie et la mitophagie chez la souris *mdx*

Chez la souris *mdx*, la perte d'expression partielle de NAF-1 n'a entraîné aucune modification significative ($p=0,369$) de l'autophagie basale à 6 ($p=0,609$) et 12 ($p=0,759$) semaines (figure 6.9 et tableau 6.9). De plus la variation de ce paramètre au cours du temps n'était pas significativement différentes chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* ($p=0,369$) et leurs contrôles ($p=0,094$).

L'absence de modification du profil autophagique à 6 et 12 semaines des souris *mdx* pourrait indiquer que l'ablation partielle de NAF-1 est insuffisante pour stimuler l'autophagie comme dans le modèle *Naf-1^{-/-}*. Toutefois l'absence de données pour le flux autophagique ne nous permet pas de conclure sur l'état de l'autophagie en générale.

La mesure de la mitophagie n'a pas été entreprise dans ce modèle en raison de problème technique.

Tableau 6.9 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	12	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	p (6 vs 12)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	p (6 vs 12)
Age (semaines)													
Ratio LC3 II/I {U.A}		0,720 ±0,057	0,674 ±0,064	0,609	0,603 ±0,024	0,577 ±0,080			0,759	0,094			0,369

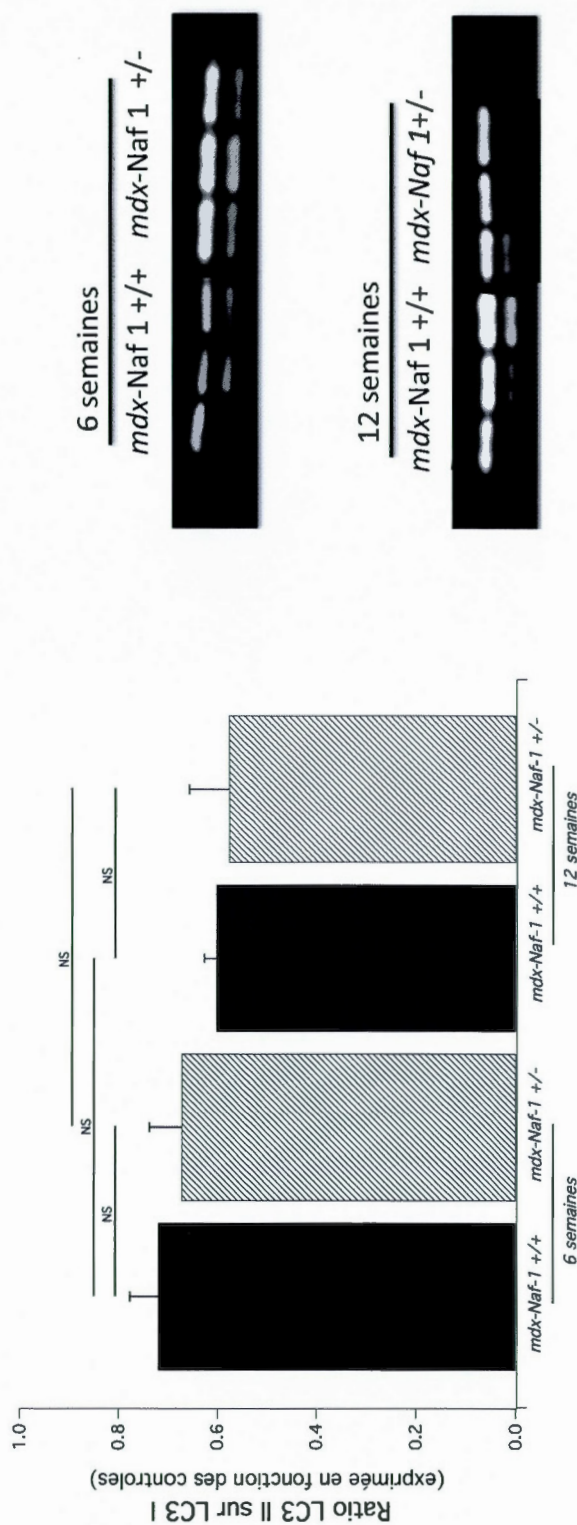


Figure 6.9 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Les quantités de protéines ont été mesurées par Western-Blot (LC3II #2775 Cell signaling 1/1000). Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

6.6 Impact de la perte d'expression partielle de NF-1 sur le contenu et les fonctions mitochondriales de la souris *mdx*

De manière à investiguer si l'ablation partielle de NAF-1 modifie la fonction mitochondriale dans le muscle dystrophique, la fonction mitochondriale a été étudiée dans le *gastrocnemius* sur des homogénats frais de muscle et des fibres perméabilisées à la saponine.

Afin de vérifier l'impact de ces modifications sur les fonctions mitochondriales la respiration et la relâche nette d' H_2O_2 , ont été mesurés sur fibres perméabilisées.

Tel que montré dans la figure 6.10, l'ablation partielle de NAF-1 chez la souris *mdx* en phase de nécrose, la respiration en glutamate + malate ($p=0,058$) et état III ($p=0,053$) tendaient fortement à diminuer, tandis que la respiration du complexe II ($p=0,007$) et IV ($p=0,002$) et à l'état dépolarisé ($p=0,022$) étaient significativement plus basses. Toutefois l'indice de couplage de l'oxydation et de la phosphorylation (ACR) n'était pas significativement différent entre nos souris *mdx-Naf-I^{+/-}* et *mdx-Naf-I^{+/+}* ($p=0,567$). Ces données semblent indiquer la perte de fonctionnalité mitochondriales associée à l'augmentation de l'activité de la CS indépendamment des autres enzymes de l'ETC.

Suite à la régénération, chez les souris *mdx-Naf-I^{+/+}*, les taux de respirations en état III ($p=0,014$) et du complexe IV ($p=0,0001$) ont significativement augmenté. Ces augmentations significatives ont également été constatées chez les souris *mdx-Naf-I^{+/-}* au niveau de la respiration du complexe IV ($p=0,0001$) et de la respiration en état découplé ($p=0,033$) ainsi qu'une tendance à l'augmentation pour la respiration du complexe II ($p=0,059$). Malgré ces augmentations, les taux de respiration restent

significativement inférieurs chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* comparés à leurs contrôles, au niveau de la respiration en état III ($p=0,06$), la respiration du complexe II ($p=0,015$), la respiration découplée ($p=0,005$) mais pas pour la respiration du complexe IV ($p=0,648$).

Tableau 6.10 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la respiration mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

semaines

Substrats	Génotype	6						12		
		<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=9)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=10)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i>	p (6 vs 12)	<i>mdx-Naf-1^{-/-}</i>
Age (semaines)										
Glutamate Malate (nmole d'O ₂ /min/mg)		1,05 ± 0,07	0,85 ± 0,05	0,058	1,26 ± 0,62	0,98 ± 0,08	0,144	0,083		0,295
ADP (nmole d'O ₂ /min/mg)		4,23 ± 0,22	3,14 ± 0,32	0,053	5,13 ± 0,38	4,01 ± 0,21	0,006	0,014		0,092
Succinate (nmole d'O ₂ /min/mg)		2,49 ± 0,16	1,51 ± 0,16	0,007	2,72 ± 0,91	2,06 ± 0,11	0,015	0,164		0,059
CCCP (nmole d'O ₂ /min/mg)		2,05 ± 0,18	1,50 ± 0,09	0,022	2,55 ± 0,71	1,89 ± 0,11	0,005	0,089		0,033
TMPPD/Ascorbate (nmole d'O ₂ /min/mg)		3,07 ± 0,24	1,94 ± 0,16	0,002	4,59 ± 0,41	4,68 ± 0,42	0,648	0,0001		0,0001
ACR (U.A)		3,98 ± 0,30	4,14 ± 0,29	0,567	4,07 ± 0,28	4,90 ± 0,32	0,173	0,962		0,168

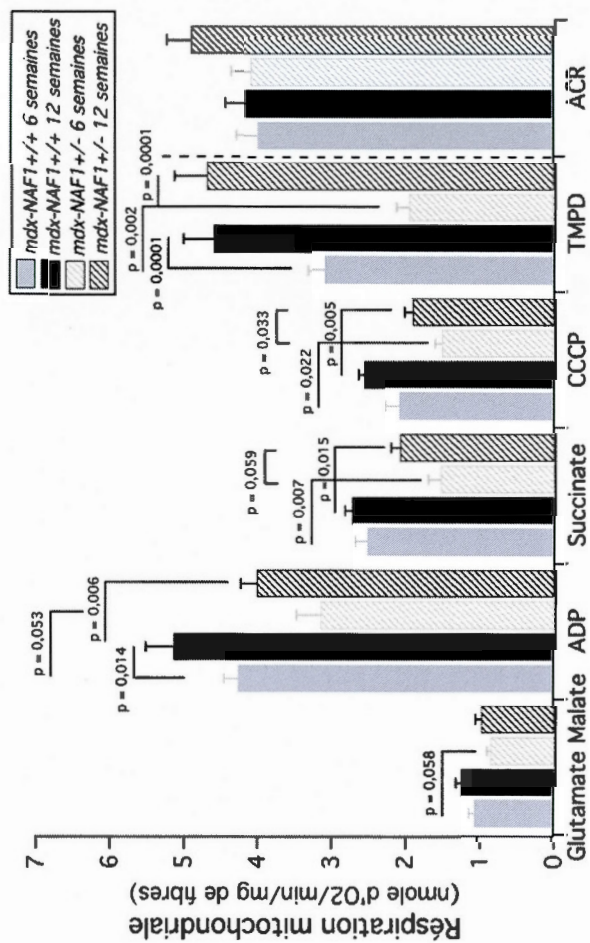


Figure 6.10 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la respiration mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Les vitesses de respiration sont exprimées en nmole d'O₂/min/mg de fibre sèches. ADP Adénosine Di-Phosphate ; CCCP Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazon; TMPD N,N,N',N' -TetraMethyl-p-PhenyleneDiamine; ACR Acceptor Control Ratio Les résultats correspondent à la moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en duplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de p < 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

On observe en figure 6.11, que la relâche nette d' H_2O_2 n'a pas été modifiée par l'ablation partielle de NAF-1 chez les souris *mdx* de 6 semaines. Toutefois considérant que les taux de respiration mitochondriale sont en moyenne 25% plus faibles chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* en phase myonécrotique, la relâche nette d' H_2O_2 par unité d'oxygène consommée peut être considérée largement supérieur à celle de leurs contrôles. Ces données s'intègrent dans l'hypothèse de la perte de fonctionnalité mitochondriale des souris *mdx-Naf-1^{+/-}* en phase myonécrotique.

À partir de la 12^{ème} semaine, l'analyse de la relâche nette d' H_2O_2 stimulée par différents substrats a révélé chez les souris *mdx-Naf-1^{+/+}* une tendance à la diminution lors de la stimulation du complexe II. Chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* cette diminution est significative ($p=0,001$).

Tableau 6.11 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la relâche nette d'H₂O₂ mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=9)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i> (n=10)	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)		612						<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i>	<i>mdx-Naf-1^{+/-}</i>
État basal (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		144 ±10,2	146 ±12,8	0,916	124 ±13,6	129 ±9,2	0,446	0,209	0,514
Glutamate (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		119,8 ±9,05	128,6 ±15	0,716	114,6 ±14,7	161,9 ±12,1	0,083	0,901	0,143
Succinate (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		2235,4 ±374	3191,3 ±302	0,111	1585,0 ±273	1607,7±178	0,087	0,053	0,001
ADP (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		140,6 ±26	181,1 ±30	0,444	175,0 ±38,3	236,9 ±35	0,654	0,346	0,776
Antimycine A (pmole d'H ₂ O ₂ /min/mg)		1092,8 ±152	1041,8 ±108	0,808	821,8 ±110	954,5 ±110	0,512	0,256	0,627

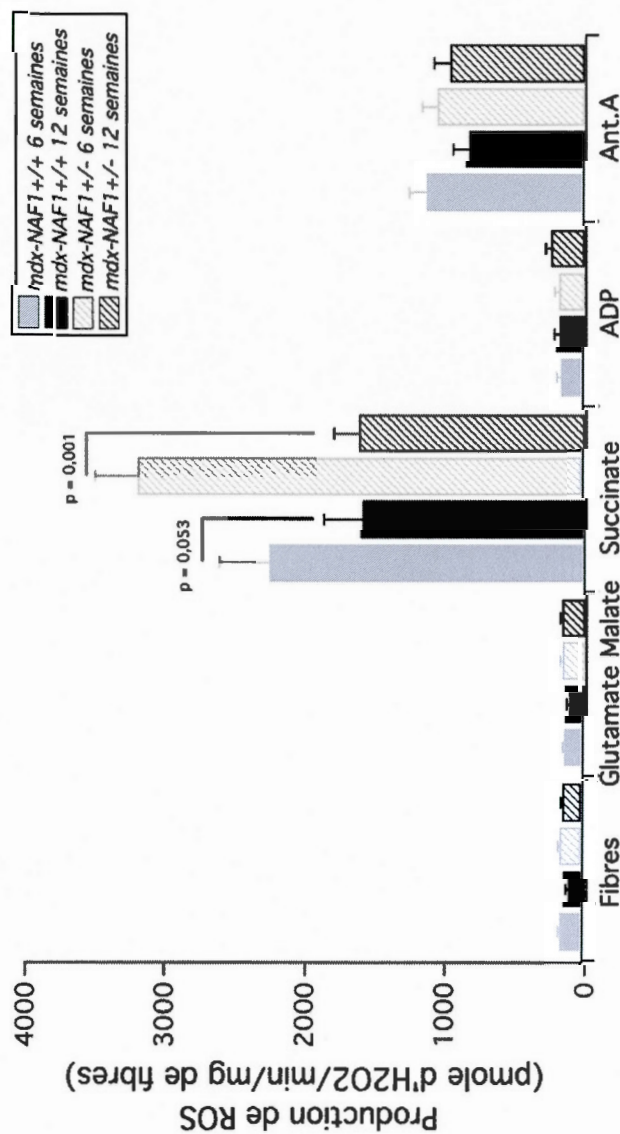


Figure 6.11 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la relâche nette d'H₂O₂ mitochondriale des souris *mdx* à 6 et 12 semaines

La relâche nette d'H₂O₂ est mesurée en pmole d'H₂O₂/min/mg de fibre sèches. ADP Adénosine Di-Phosphate ; Ant.A Antimycine A.. Les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en duplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

Pour des raisons techniques, la susceptibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité n'a pu être mesuré dans cette série d'expérience. Cependant la mesure de l'activité enzymatique des complexes I, II, IV et de la Citrate Synthase (CS) sur homogénats frais de muscle.

Dans les tableau 6.12 et figure 6.12 on observe que chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* âgées de 6 semaines, l'activité de la Citrate Synthase était 74% plus élevée par rapport aux *mdx-Naf-1^{+/+}* ($p = 0,006$), tandis que l'activité des enzymes de l'ETC n'étaient pas significativement modifiées. Ces résultats pourraient indiquer une perte potentielle de fonctionnalité de la chaîne respiratoire.

Au cours de la régénération l'activité de la Citrate synthase chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}* est augmentée de 52% ($p = 0,002$) et était significativement supérieur de 40% par rapport au souris *mdx-Naf-1^{+/+}* âgées de 12 semaines ($p = 0,03$). L'activité du complexe I était significativement diminuée chez les deux souches de souris d'environ 40% (*mdx-Naf-1^{+/+}* $p = 0,001$ et *mdx-Naf-1^{+/-}* $p = 0,0001$) tandis que l'activité du complexe IV tendait à être 72 % supérieur ($p = 0,074$) chez les *mdx-Naf-1^{+/-}* par rapport à leurs contrôles (tableau 6.12, figure 6.12).

Tableau 6.12 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Substrats	Génotype	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=9)	p	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=6)	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i> (n=10)	p	p (6 vs 12)	p (6 vs 12)
Age (semaines)		6			12			<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i>	<i>mdx-Naf-1^{+/+}</i>
Complexe I (mU/mg de protéines)		0,039 ±0,002	0,041 ±0,003	0,761	0,016 ±0,002	0,021 ±0,002	0,128	0,0001	0,0001
Complexe II (mU/mg de protéines)		7,22 ±2,00	9,41 ±2,23	0,515	4,34 ±0,70	5,88 ±0,75	0,185	0,176	0,120
Complexe IV (mU/mg de protéines)		56,91 ±15,60	69,08 ±12,48	0,549	44,41 ±9,11	77,0 ±11,62	0,074	0,529	0,650
Citrate Synthase (mU/mg de protéines)		105,60 ±10,7	183,51±16,0	0,006	197,88 ±25,6	278,9 ±21,1	0,030	0,013	0,002

(A) Activité du complexe I. (B) Activité du complexe II. (C) Activité du complexe IV. (D) Activité de la citrate synthase. Les activités enzymatiques sont mesurées en mU/mg de protéine, les résultats sont une moyenne des mesures réalisées pour chaque groupe en triplicata \pm S.E.M. Les valeurs de p ont été obtenues après des t-tests, et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

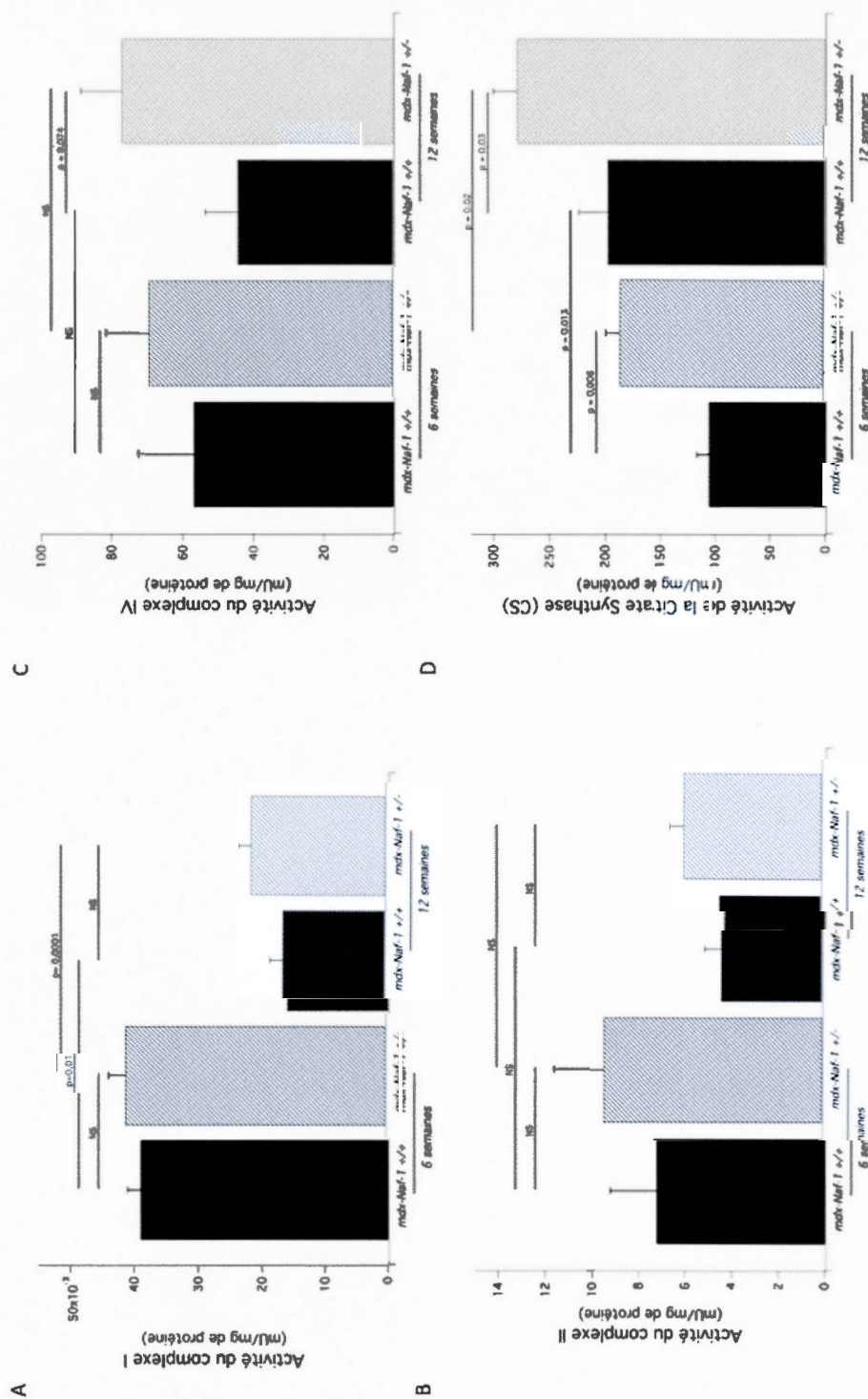


Figure 6.12 Effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur l'activité enzymatique des complexes de l'ETC et la CS chez la souris *mdx* à 6 et 12 semaines

Globalement, les analyses fonctionnelles indiquent donc que l'inactivation partielle de NAF-1 n'a entraîné aucune modification de l'autophagie basale à 6 ou 12 semaines. Toutefois il a été observé que cette ablation partielle a entraîné durant la phase myonécrotique, une perte de fonctionnalité mitochondriale révélée par la diminution des taux de respiration et une augmentation relative de la relâche nette d' H_2O_2 . Cette perte de fonctionnalité perdure à 12 semaines en phase de régénération.

Les analyses statistiques paramétriques et non-paramétriques ayant révélé les mêmes degrés de significativités et après vérification de la distribution des résultats les p choisis sont issus des test-t paramétriques.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

Tel que discuté dans la revue de littérature de ce mémoire, la dystrophie musculaire de Duchenne, est causée par l'absence de la protéine dystrophine au niveau du cytosquelette. Bien que l'absence de cette protéine constitue le défaut primaire, il est maintenant clair que les effets secondaires indirects de l'absence de la dystrophine sont des éléments centraux de la physiopathologie. À cet égard, plusieurs études provenant de divers laboratoires, incluant le notre, ont permis de démontrer que la dystrophie musculaire s'accompagnait de perturbations de fonctions mitochondriales telles que la production d'énergie [3, 5, 115, 118, 122], la relâche de radicaux libres [97, 106, 146] et la perturbation de l'homéostasie calcique [11, 60, 61, 68, 77, 106, 118, 157, 160] et que ces anomalies contribuaient de façon significative à la pathologie musculaire. De ce fait, la prévention des dysfonctions mitochondriales est de manière générale considérée comme une stratégie viable pour le traitement des dystrophinopathies [3, 5, 97, 110, 111, 122, 123, 149, 150, 178].

Dans le présent mémoire de Maitrise, nous nous sommes penchés sur le rôle des mécanismes de contrôles qualité autophagiques comme déterminant des fonctions mitochondriales dans le muscle dystrophique. L'intérêt pour ces mécanismes de contrôles de qualité a été motivé par deux facteurs importants. Le premier est l'émergence récente de plusieurs études suggérant l'importance de la mitophagie dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale et cellulaire et le rôle régulateur exercé par la E3-ligase PARKIN dans ce processus[283, 289]. Le deuxième facteur est

l'observation récente par notre groupe [4] ainsi que celui de Marco Sandri [14, 15] que l'autophagie générale est potentiellement insuffisante dans le muscle dystrophique, ce qui pourrait en partie expliquer l'accumulation de dommages mitochondriaux dans le muscle dystrophique.

Afin d'aborder cette question, nous avons sélectivement inactivé chez la souris *mdx* l'expression des gènes *Park2* et *Naf-1* codants pour des protéines connues pour leur rôle dans la régulation de la mitophagie (*i.e.* PARKIN) et de l'autophagie générale (*i.e.* NAF-1). Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis de démontrer que l'inactivation de *Park2* n'a aucun effets notables tant sur le phénotype général des souris *mdx* que des diverses fonctions mitochondriales. À priori, ces résultats suggèrent donc que la mitophagie dépendante de PARKIN n'est pas absolument essentielle pour l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles dans le muscle dystrophique. Par ailleurs, ces travaux ont également permis de mettre en évidence que l'inactivation partielle du répresseur de l'autophagie NAF-1 dans le muscle *mdx* induisait une diminution assez généralisée de la respiration mitochondriale, un accroissement relatif de la relâche mitochondriale d' H_2O_2 et une augmentation de l'activité de certaines enzymes mitochondriales suggérant des modifications qualitatives de ces organelles. Globalement, ces résultats ne sont donc pas compatibles avec l'idée que l'activation de l'autophagie générale protège contre l'accumulation de dysfonctions mitochondriales dans le muscle dystrophique. Dans les sections qui suivent, une discussion critique des résultats obtenus est présentée afin de mieux cerner leur signification et orienter les travaux futurs.

D'emblée, il est important de mentionner que compte tenu notre objectif, qui était d'investiguer le rôle des mécanismes de contrôle qualité mitochondrial dans le muscle dystrophique, aucune mesures n'ont été réalisées sur des souris contrôles exemptes de pathologie (*i.e.* les C57Bl10/ScSnJ), ce qui aurait permis de mettre directement en

évidence l'impact de la dystrophie musculaire sur le phénotype mitochondrial. Cependant, ce type de comparaisons a été réalisé dans plusieurs études antérieures et les résultats ont assez clairement démontré la présence d'anomalies mitochondriales. De plus, notre laboratoire avait déjà réalisé une comparaison des fonctions mitochondriales investiguées dans le présent travail et avait clairement démontré la présence dans le muscle de souris *mdx* d'une dépression respiratoire, d'une vulnérabilité à l'ouverture du PTP et d'une augmentation de l'activité des systèmes antioxydants mitochondriaux témoignant d'un stress oxydant chronique [3]. À la lumière de l'ensemble de ces résultats, il ne nous apparaissait donc pas prioritaire de réaliser à nouveau ce type de comparaison.

Notre premier objectif était d'observer l'effet de la perte d'expression du gène *Park2*, codant pour la protéine PARKIN sur la fonction mitochondriale des souris *mdx*.

Malgré les évidences présentes dans la littérature l'ablation de PARKIN chez la souris *mdx* n'a entraîné aucune modification du phénotype mitochondrial. Ces résultats contrastent avec les résultats d'analyse des fonctions mitochondriales chez des souris *Park2*^{-/-} exemptes de dystrophie musculaire menée par notre laboratoire (non publié) indiquant clairement la présence de dysfonctions mitochondriales modérées et multiples. Comme le montre la figure 7.1, on constate en effet chez les souris *Park2*^{-/-} une importante dépression de la respiration mitochondriale et du couplage de l'oxydation phosphorylante (ACR) ainsi qu'une diminution de l'activité des complexes I et IV de l'ETC. De plus la sensibilité du pore de transition de perméabilité est accrue. De façons intéressantes, les dysfonctions mitochondriales induite par l'inactivation de *Park2* per se sont similaires à ceux qui accompagnent la dystrophie musculaire chez les souris *mdx*. En effet, comparativement aux fonctions souris normales, les souris *mdx* affichent une dépression sévère de la consommation d'oxygène, une diminution de l'activité des complexes de l'ETC, une augmentation

de la relâche nette d' H_2O_2 et une plus grande sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité en réponse au calcium [3, 5].

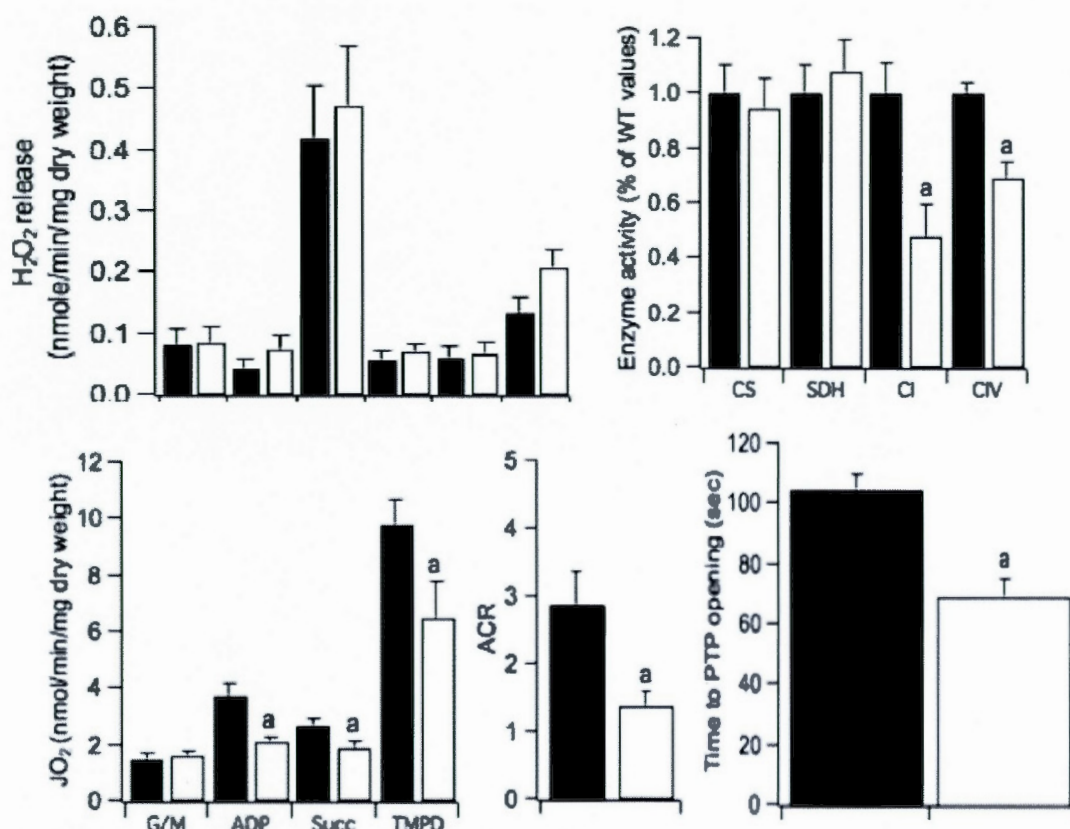


Figure 7.1 Effet de l'ablation de PARKIN sur la fonction mitochondriale

Or lors de nos diverses analyses de la fonction mitochondriale aucune différence majeure n'a pu être enregistrée entre les souris *mdx-Park2^{-/-}* et leurs contrôles *mdx-Park2^{+/+}*. Plus précisément, aucune diminution de la respiration mitochondriale, de la relâche nette d' H_2O_2 , ou de l'activité des complexes de l'ETC n'a été constatée à 6 ou 12 semaines chez les souris *mdx-Park2^{-/-}*.

Les expériences de mesure de la capacité de rétention calcique et de sensibilité du pore de transition de perméabilité n'ont pu montrer les perturbations attendues du fait de leur importante variabilité. Cette variabilité peut être expérimentale mais

également due aux manipulations génétiques menées sur ces animaux et de nouvelles mesures devraient être entreprises afin de confirmer ces résultats.

L'absence de variation des fonctions mitochondriales suite à l'inactivation de *Park2* chez les souris *mdx* semble contradictoire avec la littérature disponible, toutefois, plusieurs mécanismes permettraient d'expliquer nos observations. D'abord il est intéressant de noter que les dysfonctions mitochondriales imputables à la dystrophie musculaire ou l'inactivation de *Park2* sont comparables en amplitude. Une première possibilité serait donc une absence de cumul des dysfonctions mitochondriales, bien que nous n'ayons pas de données permettant de supporter cette hypothèse à l'heure actuelle.

Une seconde hypothèse est que chez la souris *mdx*, l'activité E3-ligase de PARKIN est déjà inhibée, minimisant ainsi l'impact de l'inactivation génétique de *Park2*. À cet égard, plusieurs études ont démontré que le stress oxydant constitue un signal pour l'activation de PARKIN [315, 316]. Or, il est également démontré qu'un excès de stress oxydant, ou encore l'oxydation de protéines spécifiques mène à une inactivation de cette E3-ligase [317, 318]. De ce fait, il est possible que le stress oxydant chronique couramment observé dans le muscle dystrophique engendre une perte d'activité de PARKIN. Cependant, aucune mesure de l'activité E3-ligase de PARKIN n'ont été réalisées chez des souris contrôles et *mdx* afin d'investiguer cette hypothèse.

Finalement, une troisième possibilité est que l'inactivation de *Park2* au niveau des cellules germinales chez les souris *mdx* pourrait mener à des réponses développementales adaptatives permettant de compenser son absence notamment au niveau de la mitophagie [319-321]. L'existence de tels mécanismes sont déjà suspecté dans le cerveau des souris *Park2*^{-/-} [322]. De plus, une analyse transcriptomique récemment réalisée par notre laboratoire dans le cœur de ces même souris démontre que l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie générale ainsi que ceux de

plusieurs E3-ligases de structure voisine à PARKIN est augmentée comparativement aux souris contrôles [323].

Si l'ablation de PARKIN entraîne effectivement des dommages mitochondriaux [281, 282], tout comme l'absence de dystrophine, l'absence de différence majeure entre les souris *mdx-Park2*^{+/+} et *mdx-Park2*^{-/-} pourrait donc être expliquée par différents mécanismes dont une augmentation compensatoire de la macro-autophagie, ou, la surexpression d'une protéine homologue.

D'après les travaux de Chen et Zou [324, 325] PARKIN est un inhibiteur de l'autophagie par le biais de son interaction avec Bcl-2. L'ablation de PARKIN entraîne donc potentiellement une augmentation de la macro-autophagie ce qui est confirmée par les données collectées dans notre laboratoire (figure 7.2; non publié) chez la souris *Park2*^{-/-}. L'absence de modification du ratio LC3 II/I à l'état basal n'indique pas de modification drastique de la macro-autophagie chez les souris *mdx-Park2*^{-/-}, toutefois l'absence de données sur le flux autophagique ne nous permet pas de conclure en l'absence de compensation par la macro-autophagie.

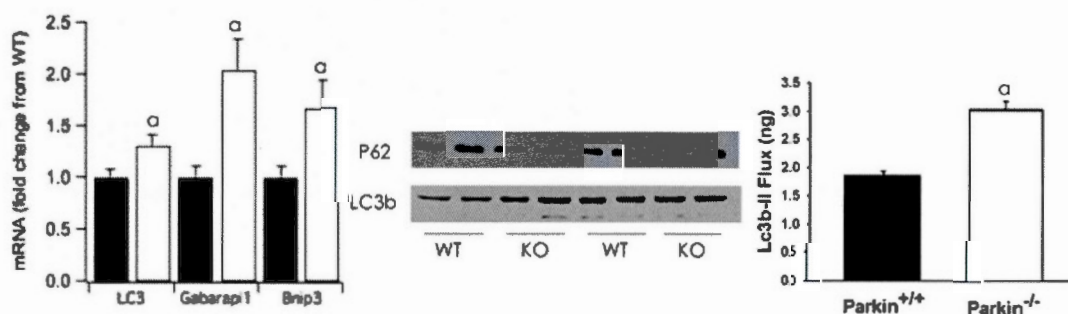


Figure 7.2 Effet de l'ablation de PARKIN sur le flux autophagique
(données non publiées)

La perte d'expression du gène *Park2* dans la lignée germinale des souris *mdx* a toutefois pu modifier l'expression de différentes E3-ligase homologues de PARKIN.

La protéine HHARI (ou ARRIH1) partage une homologie de structure RING-in-between-RING (RBR) avec PARKIN leurs permettant d'interagir avec les mêmes E2-ligases dont UBCH7 [326]. De récents travaux menés par notre laboratoire et non publiés montrent que chez les souris *Park2*^{-/-}, ARRIH1 est surexprimé 1,4X suggérant une compensation de la perte de PARKIN. Clairement, des études plus approfondies sont requises chez les souris *mdx-Park2*^{+/+} et *mdx-Park2*^{-/-}.

Le but primaire de l'ablation de PARKIN chez la souris *mdx* était d'inhiber la mitophagie comme décrit dans la littérature [283, 289, 327]. Or il n'existe aucun moyen direct de mesurer ce mécanisme *in vivo* et ce travail de recherche a permis de développer une nouvelle technique dont la validité reste à confirmer.

En effet la combinaison de la mesure du flux autophagique par l'inhibition de la fusion des auto-phagosomes avec les lysosomes [262], avec la mesure du contenu mitochondrial a permis de mesurer le flux mitophagique et le ratio obtenu entre les quantités de protéines après inhibition et avant inhibition en est l'indicateur. A l'évidence, cette nouvelle technique nécessite d'être confrontée aux différentes techniques indirectes de mesure de la mitophagie afin de valider son utilisation et les interprétations issues de cette méthode. Ces techniques validées sont entre autres, l'évaluation par microscopie électronique du nombre de d'autophagosomes contenant uniquement des mitochondries.

Bien que cette méthode expérimentale ne soit pas encore validée et que l'échantillonnage mesuré soit faible, nos données indiquent, en accord avec la littérature [281, 282], qu'en l'absence de PARKIN le flux mitophagique serait ralenti. En effet on observe une accumulation de protéines de l'ETC à l'état basal supérieure chez les *mdx-Park2*^{-/-} tandis que le ratio de flux mitophagique est inférieur au *mdx-Park2*^{+/+}.

Suite à la validation de cette nouvelle méthode, de nouvelles données devraient compléter les analyses préliminaires menées dans cette étude.

Considérant l'ensemble de nos résultats, soit l'absence de modification du phénotype mitochondriale lors de l'ablation de PARKIN chez la souris *mdx*, mit en perspective de la littérature fondant ce projet, nous pouvons raisonnablement conclure que l'inactivation de *Park2* n'a aucun effets notables tant sur le phénotype général des souris *mdx* que des diverses fonctions mitochondriales. À priori, ces résultats suggèrent donc que la mitophagie dépendante de PARKIN n'est pas absolument essentielle pour l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles dans le muscle dystrophique.

Les différents paradigmes proposés pour expliquer l'absence de modification de la fonction mitochondriale lors de l'inactivation de *Park2* sont 1) l'absence de cumul des dysfonctions 2) l'inactivation de PARKIN par les ROS 3) la compensation par la macro-autophagie et finalement 4) la compensation par une protéine homologue.

Ce projet de recherche aura également permis de développer une nouvelle technique de mesure de la mitophagie dont la précision et la fiabilité restent à valider.

Notre second objectif était d'observer l'effet de la perte d'expression partielle du gène *Naf-1*, codant pour la protéine NAF-1 sur l'autophagie et la fonction mitochondriale des souris *mdx*.

Le développement récent d'un modèle de souris transgénique présentant entre autre l'augmentation basale du ratio LC3 II/I et du flux autophagie (figure 7.3) [224, 228], nous a permis de tester l'hypothèse de l'amélioration du phénotype dystrophique musculaire et mitochondriale chez la souris *mdx* par la stimulation de l'autophagie [4, 15, 241, 254].

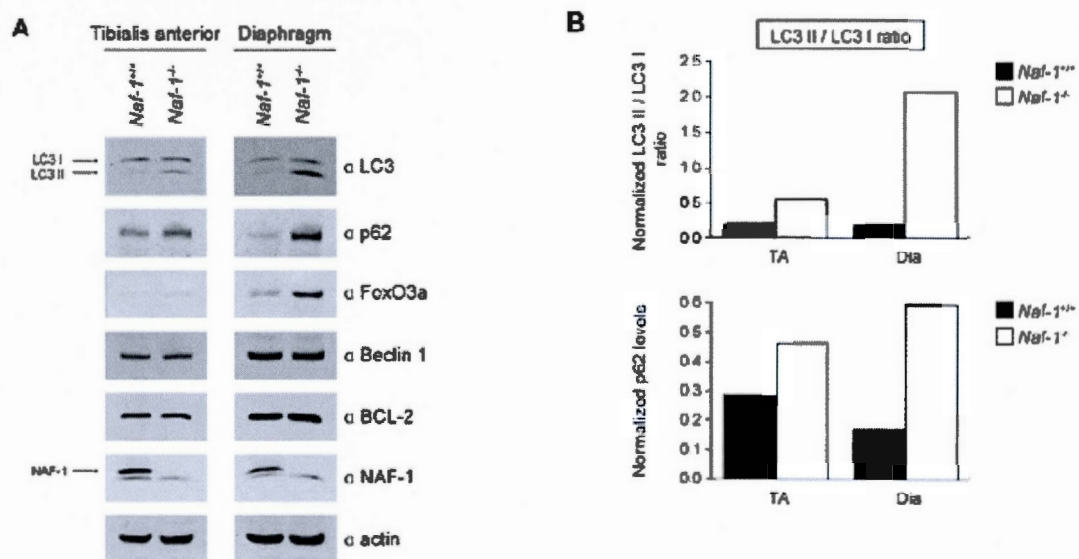


Figure 7.3 Effet de l'ablation de NAF-1 sur le ratio LC3 II/I et le flux autophagique chez la souris [228]

Ce modèle développé par l'équipe de Shore, présente en plus d'une augmentation de l'autophagie (basale et flux), un large panel de modifications relatives au muscle strié squelettique dont un changement du typage de fibre vers un type de fibre lent et une diminution de la force musculaire. De plus il a été constaté une modification importante des concentrations de calcium intra-réticulaire [228].

Afin d'augmenter la macro-autophagie chez les souris *mdx* et, considérant qu'un excès d'autophagie pourrait être délétère et entraîner une pathologie musculaire comme c'est le cas chez la souris *Naf-1^{-/-}* et dans d'autres modèles [268-270], nous avons opté pour le croisement hétérozygote de la mutation, afin de générer des souris *mdx-Naf-1^{+/-}*.

Nos analyses du ratio LC3 II/I n'indiquent aucune variation comparable au modèle *Naf-1^{-/-}*, soulignant l'absence de modification drastique de la macro-autophagie. Toutefois l'absence de mesure du flux autophagique selon les normes établies [262], ne nous permet pas de conclure quand à une variation potentielle de l'autophagie dans notre nouveau modèle *mdx-Naf-1^{+/-}*.

Toutefois il est remarquable de constater l'effet de l'ablation partielle de NAF-1 sur la fonction mitochondriale. En effet, nos observations au cours de ces travaux indiquent une dépression systématique de la consommation d'oxygène supérieur ou égale à 25% et ce pour une majorité des états respiratoires sans toutefois que l'ACR ne change. De plus on constate une augmentation relative de la relâche nette d'H₂O₂ par unité d'oxygène consommée.

Cette perturbation des fonctions mitochondriales n'est semble t'il pas due à une augmentation de la macro-autophagie puisque l'augmentation de la macro-autophagie induirait une diminution du contenu mitochondrial et, potentiellement, une diminution des dysfonctions mitochondriales. Or chez les souris *mdx-Naf-1^{+/-}*, on constate une forte perturbation des fonctions mitochondriales et aucun des marqueurs (activités des enzymes de l'ETC, et CS) n'indique une diminution du contenu mitochondrial.

Les causes de cette dépression de la respiration et de l'augmentation du stress oxydant pourraient provenir des rôles alternatifs de NAF-1 notamment au niveau de la régulation calcique.

NAF-1 interagit avec BCL-2 au niveau du réticulum endoplasmique [224] et son absence résulte en une incapacité de BCL-2 à réguler normalement les flux de Ca^{2+} sortant du réticulum, entraînant ainsi une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intra-réticulaire [224, 228]. Cette diminution du calcium cytosolique peut avoir deux conséquences majeures au niveau de la cellule 1) au niveau des mitochondries 2) au niveau de l'autophagie.

Le calcium est essentiel au fonctionnement mitochondrial. En effet, plusieurs deshydrogénases du cycle de Krebs ainsi que certains complexes de la chaîne respiratoire sont activés par le calcium [328-330], permettant ainsi une activation simultanée de la contraction et du métabolisme énergétique. En réponse à l'inactivation partielle de *Naf1*, la diminution du calcium cytosolique et ses répercussions sur le calcium mitochondrial pourrait donc entraîner une dépression de la respiration mitochondriale dans divers états respiratoires.

Par ailleurs, les travaux de Hoyer-Hansen ont démontré que la diminution du calcium dans l'espace cytosolique entraînait une inhibition de l'autophagie [237]. La séquestration du calcium intra-réticulaire pourrait donc entraîner une inhibition de l'autophagie et par conséquent le ralentissement de la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles.

Par conséquent on pourrait établir que la perte d'expression partielle de *Naf-1* entraîne la séquestration du Ca^{2+} dans le reticulum sarcoplasmique diminuant ainsi la disponibilité de celui-ci dans le cytosol. Cette modification de l'homéostasie calcique mènerait alors à une diminution des fonctions mitochondriales accompagnée d'un ralentissement du processus autophagique. Cependant, des études plus poussées sont requise afin de déterminer si cette hypothèse permet de rendre compte de la dépression respiratoire systématique et la persistance de défauts fonctionnels mitochondriaux observés dans nos travaux.

Considérant l'ensemble de nos résultats, mit en perspective de la littérature fondant ce projet, nous avons pu rejeter la théorie d'une accélération du processus autophagique dans notre modèle afin d'expliquer les défauts de la fonction mitochondriale observés. Les études mené par le groupe de Shore [224, 228] permettent d'établir qu'outre le rôle inhibiteur de NAF-1 dans le processus autophagie, cette protéine joue un rôle essentiel dans la séquestration du calcium réticulaire.

Notre étude démontre que l'inhibition partielle de NAF-1 entraîne une dépression de la fonction mitochondriale et potentiellement une inhibition de l'autophagie menant à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles dans le muscle dystrophique.

Afin d'établir plus nettement l'impact de l'ablation partielle de NAF-1 dans le muscle de la souris dystrophique et de renforcer l'hypothèse de l'importance du rôle du calcium dans l'apparition du phénotype mitochondriale de la souris *mdx-Naf-1^{+/-}*, plusieurs expérimentations devraient être entreprises.

La mesure du flux autophagique permettrait de confirmer l'absence de changement drastique de la macro-autophagie. La mesure du flux mitophagique permettrait d'évaluer d'une part un potentiel rôle compensatoire de ce mécanisme mais également d'apprécier l'accumulation de ces organelles.

Enfin l'évaluation des changements de l'homéostasie calcique cellulaire, ainsi que les paramètres de rétention calcique mitochondriale et de susceptibilité du mPTP, pourraient confirmer notre hypothèse d'une dérégulation calcique dans notre modèle *mdx-Naf-1^{+/-}*.

La modulation de l'expression de gènes spécifiques liés à la mitophagie (*i.e. Park2*) et à la macro-autophagie (*i.e. Naf-1*) ne nous a pas permis, malgré les évidences présentes dans la littérature, d'observer leur rôle dans la physiopathologie de la DMD. Nos observations permettent d'établir que le principal obstacle à l'observation de ces phénomènes et l'extrême complexité qui les régit. De plus la redondance de certains mécanismes cellulaires essentiels (*i.e. au moins trois mécanismes connus de la mitophagie*), ainsi que les divers rôles d'une même protéine (*i.e. NAF-1, inhibiteur de l'autophagie et régulateur de l'homéostasie calcique réticulaire*) rendent l'élaboration de modèles transgéniques spécifiques plus complexe. Enfin la création de lignées transgéniques constitutives peut entraîner l'organisme hôte à développer des mécanismes compensatoires annulant l'effet de la modification.

Afin de moduler des mécanismes aussi essentiels et fins que l'autophagie ou la mitophagie, l'utilisation de drogues spécifiques à ces mécanismes pourrait être une des alternatives les plus fructueuse. Toutefois, le développement d'ARN interférant injectables ou de lignées transgéniques inductibles sont également des stratégies envisageables bien que plus coûteuses.

Dans l'idée de créer des modèles solides de modulation de l'autophagie et de la mitophagie, l'obtention de preuves de concept sur des modèles cellulaires (*i.e.*

fibroblastes de patients, cultures primaires de myoblastes *mdx*) permettrait à court terme d'établir le modèle le plus réalisable et performant pour l'étude de ces mécanismes en condition pathologique.

Enfin la finalisation de la méthode d'estimation de la mitophagie par le flux et le développement d'outils spécifiques de mesure de la dégradation mitochondriale, permettraient de simplifier l'étude de ce processus cellulaire, et bénéficierait largement à la communauté scientifique dédiée à cette (magnifique) organelle.

CONCLUSION

Ce travail avait pour but d'établir le rôle de l'autophagie et de la mitophagie dans l'optimisation des fonctions mitochondriales dans le muscle dystrophique, afin de mieux comprendre ces mécanismes dans la pathologie et potentiellement d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques en lien avec ces mécanismes.

C'est grâce à l'usage de deux modèles transgéniques que nous avons essayé de moduler ces deux mécanismes dans le muscle de souris *mdx*. Toutefois, due à la complexité de ces phénomènes, à l'existence de mécanismes compensatoires ou redondants due à leur importance au niveau de la cellule, aucune stratégie de modulation de l'autophagie ou de la mitophagie n'ont eu le succès escompté. De ce fait aucune altération ou amélioration des fonctions mitochondriales n'ont pu être décrites au cours de ces travaux.

Rôle de la mitophagie sur la fonction mitochondriale du muscle dystrophique

Malgré les différentes expérimentations menées au cours de cette maîtrise, les objectifs n'ont pu être atteints intégralement. Nos hypothèses n'ont put être vérifiées face à la complexité des systèmes régissant la mitophagie au sein du muscle squelettique dystrophique mais également dû au manque de techniques spécifiques pour mesurer la mitophagie. La méthode utilisée au cours de ces travaux et en cela

très novatrice et il serait intéressant de la comparer avec les différents moyens connus afin de vérifier son efficacité et sa précision.

Toutefois nous avons pu déterminer que la perte d'expression du gène *Park2* chez la souris *mdx* n'entraînait pas d'accumulation de mitochondrie dysfonctionnelles.

Afin de compléter et d'approfondir ces travaux, une série d'expérience devraient être entreprise dont a) l'évaluation de la mitophagie par différentes méthode dont la microscopie électronique, b) la caractérisation du flux autophagique des souris *mdx-Park2^{-/-}*, c) la mesure de l'expression des gènes responsables des mécanismes compensatoires précédemment décrits et la détermination de leur importance dans le mécanismes mitophagique, d) la réalisation d'un modèle inductible de l'ablation de *Park2* chez la souris *mdx* afin d'éliminer la compensation potentielle due à la modification génétique de la lignée germinale.

De plus, afin de développer une nouvelle technique de mesure de la mitophagie, il devrait être entrepris une série d'expérimentation *in vitro* et *in vivo* afin d'établir si la mesure de l'accumulation des protéines mitochondriales au cours du blocage de l'autophagie pourrait remplacer ou compléter les différentes mesures existantes.

Rôle de l'autophagie sur la fonction mitochondriale du muscle dystrophique

Les hypothèses proposées dans ce travail de recherche n'ont pu être vérifié en raison du modèle murin utilisé. En effet, l'ablation partielle de l'expression du gène *Naf-1*, n'a pas entraîné l'augmentation de l'autophagie basale dans le *gastrocnemius* comme nous l'avions supposé et l'absence de donnée de flux empêche la détermination du profil autophagique de cette nouvelle lignée.

Toutefois les données collectées sur ce modèle ont permis d'élargir le rôle de NAF-1 dans le muscle strié squelettique dystrophique mais également au niveau de la mitochondrie.

Afin de compléter et d'approfondir ces travaux, une série d'expérience devraient être entreprise dont a) l'évaluation d'une potentielle compensation allélique dans le modèle hétérozygote *mdx-Naf-1*^{+/-}, b) la caractérisation du flux autophagique des souris *mdx-Naf-1*^{+/-}, c) L'évaluation de la perturbation de l'homéostasie calcique au niveau cellulaire et mitochondrial, d) la réalisation d'un modèle de modulation de l'autophagie par des moyens chimiques ou génétiques, transitoires ou stables, dont la cible serait plus étroitement liée à l'autophagie et où la perte d'expression ou la sur-activation n'aurait peu ou pas de conséquence sur des modulateurs directs de la fonction mitochondriale comme l'homéostasie calcique, le stress oxydant ou la disponibilité des substrats énergétiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Burelle, Y., et al., *Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **48**(2): p. 310-321.
2. Ascah, A., et al., *Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **300**(1): p. H144-H153.
3. Godin, R., et al., *Peroxisome proliferator - activated receptor γ coactivator 1 - α gene transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post - necrotic mdx mouse skeletal muscle*. The Journal of Physiology, 2012. **590**(21): p. 5487-5502.
4. Pauly, M., et al., *AMPK Activation Stimulates Autophagy and Ameliorates Muscular Dystrophy in the *mdx* Mouse Diaphragm*. The American journal of pathology, 2012. **181**(2): p. 583-592.
5. Kuznetsov, A.V., et al., *Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse*. Molecular and cellular biochemistry, 1998. **183**(1-2): p. 87-96.
6. Sharma, U., et al., *Skeletal muscle metabolism in Duchenne muscular dystrophy (DMD): an in-vitro proton NMR spectroscopy study*. Magnetic resonance imaging, 2003. **21**(2): p. 145-153.
7. Baron, D., et al., *Immune response and mitochondrial metabolism are commonly deregulated in DMD and aging skeletal muscle*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e26952.

8. Disatnik, M.-H., et al., *Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state*. Journal of the Neurological Sciences, 1998. **161**(1): p. 77-84.
9. Kaczor, J.J., et al., *Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **43**(1): p. 145-154.
10. Lucas-Heron, B., *Skeletal muscle of patients with Duchenne's muscular dystrophy: Evidence of a mitochondrial proteolytic factor responsible for calmitine deficiency*. Biochemical and biophysical research communications, 1996. **223**(1): p. 31-35.
11. Gailly, P., *New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2002. **1600**(1): p. 38-44.
12. Constantin, B., S. Sebillé, and C. Cognard, *New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD*. Journal of Muscle Research & Cell Motility, 2006. **27**(5-7): p. 375-386.
13. Basset, O., et al., *Bcl-2 overexpression prevents calcium overload and subsequent apoptosis in dystrophic myotubes*. Biochem. J., 2006. **395**: p. 267-276.
14. Spitali, P., et al., *Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice*. PLoS currents, 2013. **5**.
15. De Palma, C., et al., *Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy*. Cell death & disease, 2012. **3**(11): p. e418.
16. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. Rejuvenation research, 2005. **8**(1): p. 3-5.

17. Duchenne, G., *De l'ataxie locomotrice progressive, recherches sur une maladie caracterisée spécialement par les troubles généraux de la coordination des mouvements*. Arch Gen Med, 1858. **12**: p. 417-451.
18. Finsterer, J. and C. Stöllberger, *The heart in human dystrophinopathies*. Cardiology, 2003. **99**(1): p. 1-19.
19. Giliberto, F., et al., *Symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy (DMD): Genetic and clinical characterization*. Journal of the Neurological Sciences, 2014. **336**(1-2): p. 36-41.
20. Tyler, K.L., *Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy"*. Muscle & nerve, 2003. **28**(4): p. 402-422.
21. Emery, A.E., *The muscular dystrophies*. The Lancet, 2002. **359**(9307): p. 687-695.
22. J Fairclough, R., K. J Perkins, and K. E Davies, *Pharmacologically targeting the primary defect and downstream pathology in Duchenne muscular dystrophy*. Current gene therapy, 2012. **12**(3): p. 206-244.
23. Jansen, M., et al., *Physical training in boys with Duchenne Muscular Dystrophy: the protocol of the No Use is Disuse study*. BMC Pediatr, 2010. **10**: p. 55.
24. Call, J.A., et al., *Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse*. Muscle Nerve, 2010. **42**(6): p. 871-80.
25. Bulfield, G., et al., *X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(4): p. 1189-1192.
26. Deconinck, A.E., et al., *Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1997. **90**(4): p. 717-727.
27. Cirak, S., et al., *Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate*

- morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study.* The Lancet, 2011. **378**(9791): p. 595-605.
28. Popplewell, L., et al., *P07 Meganuclease-enhanced genome correction therapy for Duchenne muscular dystrophy.* Neuromuscular Disorders, 2012. **22**: p. S9.
 29. Yang, L., et al., *Effective Exon Skipping and Dystrophin Restoration by 2' - O-Methoxyethyl Antisense Oligonucleotide in Dystrophin-Deficient Mice.* PloS one, 2013. **8**(4): p. e61584.
 30. Fairclough, R.J., M.J. Wood, and K.E. Davies, *Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches.* Nature Reviews Genetics, 2013. **14**(6): p. 373-378.
 31. Petrof, B.J., *Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex.* Am J Phys Med Rehabil, 2002. **81**(11 Suppl): p. S162-74.
 32. Watkins, S.C., et al., *Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres.* Nature, 1988. **333**(6176): p. 863-6.
 33. Cullen, M.J., et al., *Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle by using gold immunolabelling.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1990. **240**(1297): p. 197-210.
 34. Edwards, R., et al., *Role of mechanical damage in pathogenesis of proximal myopathy in man.* The Lancet, 1984. **323**(8376): p. 548-552.
 35. Karpati, G. and S. Carpenter, *The deficiency of a sarcolemmal cytoskeletal protein (dystrophin) leads to the necrosis of skeletal muscle fibres in Duchenne-Becker dystrophy.* Neuromuscular Junction. Amsterdam, Elsevier, 1988: p. 429-36.
 36. Jansen, M., et al., *Assisted bicycle training delays functional deterioration in boys with duchenne muscular dystrophy: the randomized controlled trial "no use is disuse".* Neurorehabil Neural Repair, 2013. **27**(9): p. 816-27.

37. Weller, B., G. Karpati, and S. Carpenter, *Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions*. J Neurol Sci, 1990. **100**(1-2): p. 9-13.
38. Cullen, M.J. and E. Jaros, *Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy*. Acta Neuropathol, 1988. **77**(1): p. 69-81.
39. Head, S.I., D.A. Williams, and D.G. Stephenson, *Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice*. Proc Biol Sci, 1992. **248**(1322): p. 163-9.
40. Petrof, B.J., et al., *Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3710-4.
41. Sacco, P., et al., *Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle*. Clin Sci (Lond), 1992. **82**(2): p. 227-36.
42. McArdle, A., R.H. Edwards, and M.J. Jackson, *Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient mdx mouse*. Clin Sci (Lond), 1991. **80**(4): p. 367-71.
43. McArdle, A., R.H. Edwards, and M.J. Jackson, *Accumulation of calcium by normal and dystrophin-deficient mouse muscle during contractile activity in vitro*. Clin Sci (Lond), 1992. **82**(4): p. 455-9.
44. Cullen, M.J., et al., *Co-localization of Dystrophin and β -Dystroglycan Demonstrated in En Face View by Double Immunogold Labeling of Freeze-fractured Skeletal Muscle*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1998. **46**(8): p. 945-953.
45. Jarrett, H.W. and J.L. Foster, *Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5578-86.

46. Brushia, R.J. and D.A. Walsh, *Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D618-41.
47. Paudel, H.K. and G.M. Carlson, *Functional and structural similarities between the inhibitory region of troponin I coded by exon VII and the calmodulin-binding regulatory region of the catalytic subunit of phosphorylase kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7285-9.
48. Saimi, Y. and C. Kung, *Calmodulin as an ion channel subunit*. Annual review of physiology, 2002. **64**(1): p. 289-311.
49. Mishra, S.K., et al., *Calcium, calmodulin and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human muscular disorders*. Journal of the Neurological Sciences, 1992. **109**(2): p. 215-218.
50. Chakkalakal, J.V., et al., *Targeted inhibition of Ca²⁺ /calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in mdx mouse muscle*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(9): p. 1423-35.
51. Brenman, J.E., et al., *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1995. **82**(5): p. 743-752.
52. Förstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. European heart journal, 2012. **33**(7): p. 829-837.
53. Nisoli, E. and M.O. Carruba, *Nitric oxide and mitochondrial biogenesis*. Journal of cell science, 2006. **119**(14): p. 2855-2862.
54. Brown, G.C. and C.E. Cooper, *Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase*. FEBS Letters, 1994. **356**(2-3): p. 295-298.
55. Semenza, G.L., *Perspectives on Oxygen Sensing*. Cell, 1999. **98**(3): p. 281-284.

56. Chang, W.-J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(17): p. 9142-9147.
57. Bodensteiner, J.B. and A.G. Engel, *Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies*. Neurology, 1978. **28**(5): p. 439-46.
58. Fingerman, E., J. Campisi, and A.B. Pardee, *Defective Ca²⁺ metabolism in Duchenne muscular dystrophy: effects on cellular and viral growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(23): p. 7617-7621.
59. Mongini, T., et al., *Free cytoplasmic Ca⁺⁺ at rest and after cholinergic stimulus is increased in cultured muscle cells from Duchenne muscular dystrophy patients*. Neurology, 1988. **38**(3): p. 476-476.
60. Turner, P.R., et al., *Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice*. Nature, 1988. **335**(6192): p. 735-738.
61. Gailly, P., et al., *Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice*. Cell Calcium, 1993. **14**(6): p. 473-483.
62. Head, S., *Membrane potential, resting calcium and calcium transients in isolated muscle fibres from normal and dystrophic mice*. The Journal of physiology, 1993. **469**(1): p. 11-19.
63. Pressmar, J., et al., *Intracellular Ca²⁺ concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres*. Pflügers Archiv, 1994. **426**(6): p. 499-505.
64. Rivet-Bastide, M., et al., *Changes in cytosolic resting ionized calcium level and in calcium transients during in vitro development of normal and*

- Duchenne muscular dystrophy cultured skeletal muscle measured by laser cytofluorimetry using indo-1.* Cell calcium, 1993. **14**(7): p. 563-571.
65. Samaha, F.J. and J. Gergely, *Biochemical abnormalities of the sarcoplasmic reticulum in muscular dystrophy.* New England Journal of Medicine, 1969. **280**(4): p. 184-188.
 66. Fong, P., et al., *Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin.* Science, 1990. **250**(4981): p. 673-676.
 67. Franco Jr, A. and B. Lansman, *Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in.* Nature, 1990. **344**: p. 12.
 68. Turner, P.R., et al., *Increased calcium influx in dystrophic muscle.* The Journal of cell biology, 1991. **115**(6): p. 1701-1712.
 69. Franco-Obregon, A. and J.B. Lansman, *Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice.* The Journal of Physiology, 1994. **481**(Pt 2): p. 299-309.
 70. Oguchi, K., N. Yanagisawa, and H. Tsukagoshi, *The structure of the T-system in human muscular dystrophy: A high-voltage electron-microscopic study.* Journal of the Neurological Sciences, 1982. **57**(2-3): p. 333-341.
 71. Hoffman, E.P., et al., *Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle.* Nature, 1987. **330**(6150): p. 754-8.
 72. Fahimi, H. and R. Cotran, *Permeability studies in heat-induced injury of skeletal muscle using lanthanum as fine structural tracer.* The American journal of pathology, 1971. **62**(1): p. 143.
 73. Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt, *Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(13): p. 9452-9460.

74. McCarter, G. and R. Steinhardt, *Increased activity of calcium leak channels caused by proteolysis near sarcolemmal ruptures*. The Journal of membrane biology, 2000. **176**(2): p. 169-174.
75. Oberc, M.A. and W.K. Engel, *Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle*. Lab Invest, 1977. **36**(6): p. 566-77.
76. Jackson, M.J., D.A. Jones, and R.H.T. Edwards, *Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne Muscular Dystrophy*. Clinica Chimica Acta, 1985. **147**(3): p. 215-221.
77. Bertorini, T.E., et al., *Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy*. Neurology, 1982. **32**(10): p. 1088-92.
78. Boncompagni, S., et al., *Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 1058-67.
79. Gilibert, J.A. and A.B. Parekh, *Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store - operated Ca^{2+} current ICRAC*. The EMBO Journal, 2000. **19**(23): p. 6401-6407.
80. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: II. Nature of the Ca^{2+} trigger site*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979. **195**(2): p. 460-467.
81. Brown, R.H., *Free radicals, programmed cell death and muscular dystrophy*. Current opinion in neurology, 1995. **8**(5): p. 373-378.
82. Austin, L., et al., *Potential oxyradical damage and energy status in individual muscle fibres from degenerating muscle diseases*. Neuromuscular Disorders, 1992. **2**(1): p. 27-33.
83. Asayama, K., et al., *Lipid peroxide and antioxidant enzymes in muscle and nonmuscle of dystrophic mouse*. Muscle & nerve, 1989. **12**(9): p. 742-748.
84. Hauser, E., et al., *Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse*. Neuropediatrics, 1995. **26**(05): p. 260-262.

85. Haycock, J.W., et al., *Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy*. Neuroreport, 1996. **8**(1): p. 357-361.
86. Haycock, J.W., S. Mac Neil, and D. Mantle, *Differential protein oxidation in Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Neuroreport, 1998. **9**(10): p. 2201-2207.
87. Ragusa, R.J., C.K. Chow, and J.D. Porter, *Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscular Disorders, 1997. **7**(6-7): p. 379-386.
88. Austin, L., *How the lack of dystrophin may upset calcium regulation and lead to oxidative damage*. Pathogenesis and therapy of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Raven Press, New York, 1990: p. 69-82.
89. Kumar, A. and A.M. Boriak, *Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy*. The FASEB Journal, 2003. **17**(3): p. 386-396.
90. Reid, M. and Y.P. Li, *Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle*. Acta physiologica scandinavica, 2001. **171**(3): p. 225-232.
91. Nguyen, H.X. and J.G. Tidball, *Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro*. The Journal of physiology, 2003. **547**(1): p. 125-132.
92. Wehling, M., M.J. Spencer, and J.G. Tidball, *A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice*. The Journal of Cell Biology, 2001. **155**(1): p. 123-132.
93. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(2): p. R345-R353.
94. Chao, D.S., et al., *Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy*. The Journal of experimental medicine, 1996. **184**(2): p. 609-618.

95. Crosbie, R.H., et al., *mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation*. Human molecular genetics, 1998. **7**(5): p. 823-829.
96. Chao, D.S., F. Silvagno, and D.S. Bredt, *Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase*. Journal of neurochemistry, 1998. **71**(2): p. 784-789.
97. Shkryl, V., et al., *Reciprocal amplification of ROS and Ca²⁺ signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2009. **458**(5): p. 915-928.
98. Anderson, J.E., *A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells*. Molecular biology of the cell, 2000. **11**(5): p. 1859-1874.
99. Ségalat, L., et al., *CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy*. Experimental Cell Research, 2005. **302**(2): p. 170-179.
100. Tidball, J.G. and M. Wehling-Henricks, *Expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscle reduces muscle membrane damage without increasing the expression of membrane-associated cytoskeletal proteins*. Molecular Genetics and Metabolism, 2004. **82**(4): p. 312-320.
101. Chaubourt, E., et al., *Nitric Oxide and l-Arginine Cause an Accumulation of Utrophin at the Sarcolemma: A Possible Compensation for Dystrophin Loss in Duchenne Muscular Dystrophy*. Neurobiology of Disease, 1999. **6**(6): p. 499-507.
102. Chaubourt, E., et al., *The NO way to increase muscular utrophin expression?* Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, 2000. **323**(8): p. 735-740.
103. Grote, K., et al., *Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD (P) H*

- oxidase-derived reactive oxygen species*. *Circulation research*, 2003. **92**(11): p. e80-e86.
104. Javesghani, D., et al., *Molecular characterization of a superoxide-generating NAD (P) H oxidase in the ventilatory muscles*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002. **165**(3): p. 412-418.
 105. Williams, I.A. and D.G. Allen, *The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(3): p. H1969-77.
 106. Baker, M. and L. Austin, *The pathological damage in duchenne muscular dystrophy may be due to increased intracellular oxy-radical generation caused by the absence of dystrophin and subsequent alterations in Ca^{2+} metabolism*. *Medical hypotheses*, 1989. **29**(3): p. 187-193.
 107. Rando, T.A., et al., *Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress*. *Neuromuscular Disorders*, 1998. **8**(1): p. 14-21.
 108. Disatnik, M.H., J.S. Chamberlain, and T.A. Rando, *Dystrophin mutations predict cellular susceptibility to oxidative stress*. *Muscle & Nerve*, 2000. **23**(5): p. 784-792.
 109. Buetler, T.M., et al., *Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species*. *The American journal of clinical nutrition*, 2002. **75**(4): p. 749-753.
 110. Messina, S., et al., *Lipid Peroxidation Inhibition Blunts Nuclear Factor- κ B Activation, Reduces Skeletal Muscle Degeneration, and Enhances Muscle Function in mdx Mice*. *The American journal of pathology*, 2006. **168**(3): p. 918-926.
 111. Williams, I.A. and D.G. Allen, *The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007. **293**(3): p. H1969-H1977.

112. Whitehead, N.P., et al., *N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice*. The Journal of Physiology, 2008. **586**(7): p. 2003-2014.
113. Bäckman, E., et al., *Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function*. Acta neurologica scandinavica, 1988. **78**(5): p. 429-435.
114. Fenichel, G.M., et al., *Clinical investigation in Duchenne muscular dystrophy: penicillamine and vitamin E*. Muscle & nerve, 1988. **11**(11): p. 1164-1168.
115. Müller-Höcker, J., D. Pongratz, and G. Hübner, *Activation of mitochondrial ATPase as evidence of loosely coupled oxidative phosphorylation in various skeletal muscle disorders: A histochemical fine-structural study*. Journal of the neurological sciences, 1986. **74**(2): p. 199-213.
116. Scholte, H., et al., *Carnitine deficiency, mitochondrial dysfunction and the heart. Identical defect of oxidative phosphorylation in muscle mitochondria in cardiomyopathy due to carnitine loss and in Duchenne muscular dystrophy*. Wiener klinische Wochenschrift, 1989. **101**(1): p. 12-17.
117. Sperl, W., et al., *High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders*. Molecular and cellular biochemistry, 1997. **174**(1-2): p. 71-78.
118. Glesby, M.J., et al., *Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in mdx mouse muscular dystrophy*. Muscle & nerve, 1988. **11**(8): p. 852-856.
119. Dunn, J. I. Tracey, and G. Radda, *^{31}P -NMR study of muscle exercise metabolism in mdx mice: Evidence for abnormal pH regulation*. Journal of the neurological sciences, 1992. **113**(1): p. 108-113.
120. Dunn, J.F., I. Tracey, and G.K. Radda, *Exercise Metabolism in Duchenne Muscular Dystrophy: A Biochemical and ^{31}P -nuclear Magnetic*

- Resonance Study of mdx Mice*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1993. **251**(1332): p. 201-206.
121. Gannoun-Zaki, L., et al., *Down-regulation of mitochondrial mRNAs in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy*. FEBS letters, 1995. **375**(3): p. 268-272.
 122. Jahnke, V.E., et al., *Metabolic remodeling agents show beneficial effects in the dystrophin-deficient mdx mouse model*. Skelet Muscle, 2012. **2**(1): p. 16-16.
 123. Selsby, J.T., et al., *Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30063.
 124. Handschin, C., et al., *PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy*. Genes & Development, 2007. **21**(7): p. 770-783.
 125. Kennedy, E.P. and A.L. Lehninger, *Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria*. J Biol Chem, 1949. **179**(2): p. 957-72.
 126. Kennedy, E.P. and A.L. Lehninger, *The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria*. J Biol Chem, 1950. **185**(1): p. 275-85.
 127. Loschen, G., et al., *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide*. FEBS Letters, 1974. **42**(1): p. 68-72.
 128. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(40): p. 31199-31203.
 129. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome C-mediated apoptosis*. Annual review of biochemistry, 2004. **73**(1): p. 87-106.

130. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. *cell*, 2000. **102**(1): p. 33-42.
131. Jaeschke, H. and M.L. Bajt, *Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death*. *Toxicological sciences*, 2006. **89**(1): p. 31-41.
132. Kemp, G., et al., *Cellular energetics of dystrophic muscle*. *Journal of the neurological sciences*, 1993. **116**(2): p. 201-206.
133. Lodi, R., et al., *Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy: An in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study*. *Brain*, 1999. **122**(1): p. 121-130.
134. Kuznetsov, A.V., et al., *Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells*. *Nature protocols*, 2008. **3**(6): p. 965-976.
135. Braun, U., et al., *Lack of dystrophin is associated with altered integration of the mitochondria and ATPases in slow-twitch muscle cells of MDX mice*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2001. **1505**(2-3): p. 258-270.
136. Camina, F., et al., *Purine and carnitine metabolism in muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy*. *Clinica chimica acta*, 1995. **243**(2): p. 151-164.
137. Binder, H.J., et al., *Tocopherol deficiency in man*. *New England Journal of Medicine*, 1965. **273**(24): p. 1289-1297.
138. Nakae, Y., et al., *Most apoptotic cells in mdx diaphragm muscle contain accumulated lipofuscin*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2001. **115**(3): p. 205-214.

139. Nakae, Y., et al., *Early Onset of Lipofuscin Accumulation in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscles of DMD Patients and mdx Mice*. Journal of Molecular Histology, 2004. **35**(5): p. 489-499.
140. Rando, T.A., *Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis*. Microscopy research and technique, 2001. **55**(4): p. 223-235.
141. Smythe, G.M. and J.K. Forwood, *Altered mitogen - activated protein kinase signaling in dystrophic (mdx) muscle*. Muscle & nerve, 2012. **46**(3): p. 374-383.
142. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiological reviews, 1979. **59**(3): p. 527-605.
143. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(38): p. 36027-36031.
144. Batandier, C., X. Leverve, and E. Fontaine, *Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17197-204.
145. Wang, W., et al., *Superoxide flashes in single mitochondria*. Cell, 2008. **134**(2): p. 279-90.
146. Jian, C., et al., *Regulation of superoxide flashes by transient and steady mitochondrial calcium elevations*. Sci China Life Sci, 2014. **57**(5): p. 495-501.
147. Jung, C., et al., *Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca²⁺ signalling and reactive oxygen species-generating pathways*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 766-73.

148. Rodriguez, M.C. and M.A. Tarnopolsky, *Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(9): p. 1217-1220.
149. Hori, Y.S., et al., *Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2011. **338**(3): p. 784-794.
150. Gordon, B.S., et al., *Resveratrol Improves Muscle Function but Not Oxidative Capacity in Young mdx Mice*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2014(ja).
151. Menazza, S., et al., *Oxidative stress by monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy*. Human molecular genetics, 2010. **19**(21): p. 4207-4215.
152. Gillis, J.-M., *Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review*. Acta physiologica scandinavica, 1996. **156**(3): p. 397-406.
153. Whitehead, N.P., E.W. Yeung, and D.G. Allen, *Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species*. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2006. **33**(7): p. 657-662.
154. Yeung, E.W., et al., *Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse*. J Physiol, 2005. **562**(Pt 2): p. 367-80.
155. Fanchaouy, M., et al., *Pathways of abnormal stress-induced Ca^{2+} influx into dystrophic mdx cardiomyocytes*. Cell Calcium, 2009. **46**(2): p. 114-21.
156. Allen, D.G., N.P. Whitehead, and E.W. Yeung, *Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 3): p. 723-35.

157. Williams, I.A. and D.G. Allen, *Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **292**(2): p. H846-H855.
158. Huang, J., et al., *Store-operated Ca²⁺ entry modulates sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1572-82.
159. Robert, V., et al., *Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4647-51.
160. Vandebrouck, A., et al., *Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes*. FASEB J, 2006. **20**(1): p. 136-8.
161. Bellinger, A.M., et al., *Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 325-30.
162. Doran, P., et al., *Subproteomics analysis of Ca²⁺-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle*. Eur J Biochem, 2004. **271**(19): p. 3943-52.
163. Dowling, P., P. Doran, and K. Ohlendieck, *Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 479-88.
164. Fujita, T., *Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(1): p. 1-4.
165. Yamaguchi, M., *Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review)*. Int J Mol Med, 2005. **15**(3): p. 371-89.
166. Zoratti, M. and I. Szabò, *The mitochondrial permeability transition*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1995. **1241**(2): p. 139-176.

167. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*. Science, 1993. **262**(5134): p. 744-7.
168. Babcock, D.F., et al., *Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network*. J Cell Biol, 1997. **136**(4): p. 833-44.
169. Duchen, M.R., *Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death*. The Journal of physiology, 1999. **516**(1): p. 1-17.
170. Tinel, H., et al., *Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate - evoked local cytosolic Ca^{2+} signals*. The EMBO journal, 1999. **18**(18): p. 4999-5008.
171. Lawrie, A.M., et al., *A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10753-9.
172. Hoth, M., C.M. Fanger, and R.S. Lewis, *Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes*. J Cell Biol, 1997. **137**(3): p. 633-48.
173. Hartmann, J. and A. Verkhratsky, *Relations between intracellular Ca^{2+} stores and store - operated Ca^{2+} entry in primary cultured human glioblastoma cells*. The Journal of physiology, 1998. **513**(2): p. 411-424.
174. Gunter, T.E., et al., *Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1994. **267**(2): p. C313-C339.
175. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979. **195**(2): p. 453-459.

176. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979. **195**(2): p. 468.
177. Crompton, M. and A. Costi, *A heart mitochondrial Ca²⁺ (+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states*. Biochem. J, 1990. **266**: p. 33-39.
178. Millay, D.P., et al., *Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy*. Nature medicine, 2008. **14**(4): p. 442-447.
179. Tidball, J.G., et al., *Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle*. Journal of cell science, 1995. **108**(6): p. 2197-2204.
180. Sandri, M., et al., *Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1998. **78**(8): p. 1005-1016.
181. Kolodziejczyk, S.M., et al., *Activation of JNK1 contributes to dystrophic muscle pathogenesis*. Current Biology, 2001. **11**(16): p. 1278-1282.
182. Abmayr, S., R.W. Crawford, and J.S. Chamberlain, *Characterization of ARC, apoptosis repressor interacting with CARD, in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle*. Human Molecular Genetics, 2004. **13**(2): p. 213-221.
183. Clark, S.L., *Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1957. **3**(3): p. 349-362.
184. de Duve, C. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes*. Annual review of physiology, 1966. **28**(1): p. 435-492.

185. Novikoff, A.B., H. Beaufay, and C. de Duve, *Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1956. **2**(4): p. 179.
186. Ashford, T.P. and K.R. Porter, *Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes*. The Journal of cell biology, 1962. **12**(1): p. 198-202.
187. Fujiwara, Y., et al., *Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA*. Autophagy, 2013. **9**(3): p. 403-409.
188. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1032-1036.
189. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. Nature cell biology, 2013. **15**(7): p. 713-720.
190. Chiang, H.-L., C. Plant, and J. Dice, *A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins*. Science, 1989. **246**(4928): p. 382-385.
191. Takeshige, K., et al., *Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction*. The Journal of Cell Biology, 1992. **119**(2): p. 301-311.
192. Tsukada, M. and Y. Ohsumi, *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 1993. **333**(1-2): p. 169-174.
193. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(33): p. 24131-24145.
194. Itakura, E. and N. Mizushima, *p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding*. The Journal of cell biology, 2011. **192**(1): p. 17-27.

195. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
196. Hayashi-Nishino, M., et al., *A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation*. Nature Cell Biology, 2009. **11**(12): p. 1433-1437.
197. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. The Journal of cell biology, 2001. **152**(4): p. 657-668.
198. Ylä-Anttila, P., et al., *3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum*. Autophagy, 2009. **5**(8): p. 1180-1185.
199. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. The Journal of Cell Biology, 2008. **182**(4): p. 685-701.
200. Hailey, D.W., et al., *Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation*. Cell, 2010. **141**(4): p. 656-667.
201. Zhao, T., et al., *Central role of mitofusin 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(28): p. 23615-23625.
202. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death & Differentiation, 2011. **18**(4): p. 571-580.
203. Suzuki, K., et al., *Hierarchy of Atg proteins in pre - autophagosomal structure organization*. Genes to Cells, 2007. **12**(2): p. 209-218.
204. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 488-492.

205. Dos, D.S., et al., *Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton*. Current Biology, 2004. **14**(14): p. 1296-1302.
206. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(2).
207. Lv, P., et al., *Autophagy in muscle of glucose-infusion hyperglycemia rats and streptozotocin-induced hyperglycemia rats via selective activation of m-TOR or FoxO3*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87254.
208. Greer, E.L., et al., *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30107-19.
209. Bertaggia, E., L. Coletto, and M. Sandri, *Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(3): p. C587-96.
210. Kirisako, T., et al., *The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway*. The Journal of cell biology, 2000. **151**(2): p. 263-276.
211. Cebollero, E., et al., *Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion*. Current Biology, 2012. **22**(17): p. 1545-1553.
212. Chen, D., et al., *A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate*. Molecular cell, 2012. **45**(5): p. 629-641.
213. Harrison, R.E., et al., *Phagosomes Fuse with Late Endosomes and/or Lysosomes by Extension of Membrane Protrusions along Microtubules: Role of Rab7 and RILP*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(18): p. 6494-6506.

214. Graham, S.C., et al., *Structural basis of Vps33A recruitment to the human HOPS complex by Vps16*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(33): p. 13345-13350.
215. Jiang, P., et al., *The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17*. Molecular biology of the cell, 2014. **25**(8): p. 1327-1337.
216. Tanaka, Y., et al., *Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 902-906.
217. Jäger, S., et al., *Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(20): p. 4837-4848.
218. Maiuri, M.C., et al., *BH3-Only Proteins and BH3 Mimetics Induce Autophagy by Competitively Disrupting the Interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X_L*. Autophagy, 2007. **3**(4): p. 374-376.
219. Maiuri, M.C., et al., *Functional and physical interaction between Bcl - XL and a BH3 - like domain in Beclin - 1*. The EMBO journal, 2007. **26**(10): p. 2527-2539.
220. Dohlman, W., et al., *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**: p. 440-442.
221. Bonnefoy-Berard, N., et al., *Control of proliferation by Bcl-2 family members*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1644**(2-3): p. 159-168.
222. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy*. Cell, 2005. **122**(6): p. 927-939.
223. Liang, C., *Negative regulation of autophagy*. Cell Death & Differentiation, 2010. **17**(12): p. 1807-1815.

224. Chang, N.C., et al., *Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1*. The EMBO journal, 2009. **29**(3): p. 606-618.
225. Maiuri, M.C., A. Criollo, and G. Kroemer, *Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome*. EMBO J, 2010. **29**(3): p. 515-6.
226. Chang, N.C., et al., *Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1*. EMBO J, 2010. **29**(3): p. 606-18.
227. Chen, R., et al., *Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 193-203.
228. Chang, N.C., et al., *Bcl-2-associated autophagy regulator Naf-1 required for maintenance of skeletal muscle*. Human molecular genetics, 2012. **21**(10): p. 2277-2287.
229. Clague, M.J. and O. Lorenzo, *The myotubularin family of lipid phosphatases*. Traffic, 2005. **6**(12): p. 1063-9.
230. Khalfan, W.A. and D.J. Klionsky, *Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in S. cerevisiae*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(4): p. 468-75.
231. Xia, H.G., et al., *Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5*. Autophagy, 2010. **6**(1): p. 61-6.
232. Kim, H.J., et al., *The Ca(2+) channel TRPML3 regulates membrane trafficking and autophagy*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1157-67.
233. Choi, S. and H.J. Kim, *The Ca²⁺ channel TRPML3 specifically interacts with the mammalian ATG8 homologue GATE16 to regulate autophagy*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(1): p. 56-61.

234. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. *Cell Metabolism*, 2005. **2**(1): p. 9-19.
235. Woods, A., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. *Cell Metabolism*, 2005. **2**(1): p. 21-33.
236. Shaw, R.J., et al., *The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(1): p. 91-99.
237. Høyer-Hansen, M., et al., *Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2*. *Molecular Cell*, 2007. **25**(2): p. 193-205.
238. Ionescu, L., et al., *Graded recruitment and inactivation of single InsP3 receptor Ca²⁺ - release channels: implications for quartal Ca²⁺ release*. *The Journal of physiology*, 2006. **573**(3): p. 645-662.
239. Criollo, A., et al., *Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor*. *Cell Death & Differentiation*, 2007. **14**(5): p. 1029-1039.
240. Khan, M.T. and S.K. Joseph, *Role of inositol trisphosphate receptors in autophagy in DT40 cells*. *Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(22): p. 16912-16920.
241. Sandri, M., et al., *Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies*. *Journal of Cell Science*, 2013. **126**(23): p. 5325-5333.
242. Pompe, J., *Over idiopatische hypertrophie van het hart*. *Ned Tijdschr Geneesk*, 1932. **76**: p. 304.
243. Cullup, T., et al., *Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy*. *Nature genetics*, 2013. **45**(1): p. 83-87.

244. Masiero, E. and M. Sandri, *Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles*. *Autophagy*, 2010. **6**(2): p. 307-309.
245. Nemazanyy, I., et al., *Defects of Vps15 in skeletal muscles lead to autophagic vacuolar myopathy and lysosomal disease*. *EMBO molecular medicine*, 2013. **5**(6): p. 870-890.
246. Hers, H., *α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease)*. *Biochemical Journal*, 1963. **86**(1): p. 11.
247. Deter, R.L., P. Baudhuin, and C. De Duve, *Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon*. *The Journal of cell biology*, 1967. **35**(2): p. C11-C16.
248. ENGEL, A.G., *ACID MALTASE DEFICIENCY IN ADULTS: STUDIES IN FOUR CASES OF A SYNDROME WHICH MAY MIMIC MUSCULAR DYSTROPHY OR OTHER MYOPATHIES*. *Brain*, 1970. **93**(3): p. 599-616.
249. Schiaffino, S. and V. Hanzlíková, *Autophagic degradation of glycogen in skeletal muscles of the newborn rat*. *The Journal of cell biology*, 1972. **52**(1): p. 41-51.
250. Raben, N., et al., *Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder—murine Pompe disease*. *Autophagy*, 2010. **6**(8): p. 1078.
251. Tian, Y., et al., *C. elegans Screen Identifies Autophagy Genes Specific to Multicellular Organisms*. *Cell*, 2010. **141**(6): p. 1042-1055.
252. Zhao, H., et al., *Mice deficient in Epg5 exhibit selective neuronal vulnerability to degeneration*. *The Journal of cell biology*, 2013. **200**(6): p. 731-741.
253. Zhao, Y.G., et al., *Role of Epg5 in selective neurodegeneration and Vici syndrome*. *Autophagy*, 2013. **9**(8): p. 1258-1262.
254. Masiero, E., et al., *Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass*. *Cell Metabolism*, 2009. **10**(6): p. 507-515.

255. Nishiyama, J., et al., *Aberrant Membranes and Double-Membrane Structures Accumulate in the Axons of Atg5-Null Purkinje Cells before Neuronal Death*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 591-596.
256. Nishida, Y., et al., *Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy*. *Nature*, 2009. **461**(7264): p. 654-658.
257. Sou, Y.S., et al., *The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 4762-75.
258. Vanhaesebroeck, B., et al., *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010. **11**(5): p. 329-341.
259. Muchir, A., et al., *Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. *Human molecular genetics*, 2007. **16**(15): p. 1884-1895.
260. Ramos, F.J., et al., *Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival*. *Science translational medicine*, 2012. **4**(144): p. 144ra103-144ra103.
261. Grumati, P., et al., *Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration*. *Nature medicine*, 2010. **16**(11): p. 1313-1320.
262. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. *Autophagy*, 2012. **8**(4): p. 445-544.
263. Grumati, P., et al., *Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles*. *Autophagy*, 2011. **7**(12): p. 1415-1423.

264. Eghtesad, S., et al., *Rapamycin ameliorates dystrophic phenotype in mdx mouse skeletal muscle*. Molecular Medicine, 2011. **17**(9-10): p. 917.
265. Bueno Junior, C.R., et al., *Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45699.
266. Ljubcic, V., et al., *Chronic AMPK stimulation attenuates adaptive signaling in dystrophic skeletal muscle*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2011. **302**(1): p. C110-C121.
267. Tome, F.M., et al., *Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency*. C R Acad Sci III, 1994. **317**(4): p. 351-7.
268. Carmignac, V., R. Quéré, and M. Durbeej, *Proteasome inhibition improves the muscle of laminin $\alpha 2$ chain-deficient mice*. Human Molecular Genetics, 2011. **20**(3): p. 541-552.
269. Carmignac, V., et al., *Autophagy is increased in laminin $\alpha 2$ chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A*. Human Molecular Genetics, 2011. **20**(24): p. 4891-4902.
270. Wang, X., et al., *Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle*. Genes & development, 2005. **19**(14): p. 1715-1722.
271. Kissová, I., et al., *Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(37): p. 39068-39074.
272. Kiššová, I.B., et al., *Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast*. Autophagy, 2007. **3**(4): p. 329-336.
273. Kanki, T. and D.J. Klionsky, *Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(47): p. 32386-32393.

274. Suzuki, K., *Selective autophagy in budding yeast*. Cell Death & Differentiation, 2012. **20**(1): p. 43-48.
275. Ishihara, N. and N. Mizushima, *A receptor for eating mitochondria*. Developmental cell, 2009. **17**(1): p. 1-2.
276. Eiyama, A., N. Kondo-Okamoto, and K. Okamoto, *Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast*. FEBS Letters, 2013. **587**(12): p. 1787-1792.
277. Ding, W.-X., et al., *Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(36): p. 27879-27890.
278. Kubli, D.A. and Å.B. Gustafsson, *Mitochondria and mitophagy the yin and yang of cell death control*. Circulation research, 2012. **111**(9): p. 1208-1221.
279. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
280. Greene, J.C., et al., *Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4078-83.
281. Palacino, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.
282. Kubli, D.A., M.N. Quinsay, and Å.B. Gustafsson, *Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes*. Communicative & integrative biology, 2013. **6**(4): p. e24511.
283. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. The Journal of cell biology, 2008. **183**(5): p. 795-803.

284. Scarffe, L.A., et al., *Parkin and PINK1: much more than mitophagy*. Trends in Neurosciences, (0).
285. Yang, Y., et al., *Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(28): p. 10793-10798.
286. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1162-1166.
287. Park, J., et al., *Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1157-1161.
288. Vives-Bauza, C., et al., *PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy*. Science Signaling, 2010. **107**(1): p. 378.
289. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS biology, 2010. **8**(1): p. e1000298.
290. Gautier, C.A., T. Kitada, and J. Shen, *Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11364-9.
291. Chen, Y. and G.W. Dorn, *PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria*. Science, 2013. **340**(6131): p. 471-475.
292. Gegg, M.E. and A.H.V. Schapira, *PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: Implications for Parkinson disease pathogenesis*. Autophagy, 2011. **7**(2): p. 243-245.
293. Muftuoglu, M., et al., *Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations*. Mov Disord, 2004. **19**(5): p. 544-8.
294. Pallanck, L., *Mitophagy: Mitofusin Recruits a Mitochondrial Killer*. Current Biology, 2013. **23**(13): p. R570-R572.

295. Chen, G., et al., *The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a Dimeric Mitochondrial Protein that Activates Apoptosis*. The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(12): p. 1975-1983.
296. Chen, G., et al., *Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(1): p. 7-10.
297. Zhang, H., et al., *Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(16): p. 10892-10903.
298. Mammucari, C., et al., *FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo*. Cell Metabolism, 2007. **6**(6): p. 458-471.
299. Novak, I., et al., *Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance*. EMBO reports, 2010. **11**(1): p. 45-51.
300. Liu, L., et al., *Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells*. Nature Cell Biology, 2012. **14**(2): p. 177-185.
301. Chu, C.T., et al., *Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells*. Nature cell biology, 2013. **15**(10): p. 1197-1205.
302. Periquet, M., et al., *Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function*. Journal of neurochemistry, 2005. **95**(5): p. 1259-1276.
303. Perez, F.A. and R.D. Palmiter, *Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(6): p. 2174-2179.
304. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1987. **892**(2): p. 191-196.

305. Picard, M., et al., *Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18317.
306. Saks, V.A., et al., *Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo*, in *Bioenergetics of the Cell: Quantitative Aspects*. 1998, Springer. p. 81-100.
307. Gouspillou, G., et al., *Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans*. FASEB J, 2014. **28**(4): p. 1621-33.
308. Picard, M., et al., *Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008. **295**: p. 659-668.
309. Harlow, E. and D. Lane, *Immunoprecipitation*. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 1988.
310. Smith, P., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
311. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Analytical biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
312. Burnette, W.N., *Western Blotting*. Clinical Chemistry, 2011. **57**(1): p. 132-133.
313. Ju, J.-S., et al., *Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle*. Autophagy, 2010. **6**(7): p. 929-935.
314. Zhang, X.-j., et al., *Why should autophagic flux be assessed?* Acta Pharmacologica Sinica, 2013.

315. Wang, Y., et al., *ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(10): p. 1462-76.
316. Wei, X., et al., *Cadmium induces mitophagy through ROS-mediated PINK1/Parkin pathway*. Toxicol Mech Methods, 2014. **24**(7): p. 504-11.
317. Janda, E., et al., *Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress*. Molecular neurobiology, 2012. **46**(3): p. 639-661.
318. Jinsmaa, Y., et al., *Dopamine-derived biological reactive intermediates and protein modifications: Implications for Parkinson's disease*. Chem Biol Interact, 2011. **192**(1-2): p. 118-21.
319. Quinsay, M.N., et al., *Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore*. Autophagy, 2010. **6**(7): p. 855-862.
320. Zhang, J. and P.A. Ney, *Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy*. Cell Death & Differentiation, 2009. **16**(7): p. 939-946.
321. Allen, G.F., et al., *Loss of iron triggers PINK1/Parkin - independent mitophagy*. EMBO reports, 2013. **14**(12): p. 1127-1135.
322. Shin, J.H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
323. Bhandari, P., et al., *Mitochondrial contagion induced by Parkin deficiency in Drosophila hearts and its containment by suppressing mitofusin*. Circ Res, 2014. **114**(2): p. 257-65.
324. Chen, D., et al., *Parkin Mono-ubiquitinates Bcl-2 and Regulates Autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(49): p. 38214-38223.
325. Zou, J., et al., *Autophagy inhibitor LRPPRC suppresses mitophagy through interaction with mitophagy initiator Parkin*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94903.

- 326. Wenzel, D.M., et al., *UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids*. Nature, 2011. **474**(7349): p. 105-108.
- 327. Hara, Y., et al., *Hepatitis C Virus Core Protein Suppresses Mitophagy by Interacting with Parkin in the Context of Mitochondrial Depolarization*. Am J Pathol, 2014.
- 328. McCormack, J.G. and R.M. Denton, *Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism*. Dev Neurosci, 1993. **15**(3-5): p. 165-73.
- 329. Balaban, R.S., *Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1259-71.
- 330. Hansford, R.G. and D. Zorov, *Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation*. Mol Cell Biochem, 1998. **184**(1-2): p. 359-69.